

GUSTAVO CAMPOS RAMOS

**EFEITO DE LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILSERINA NO CURSO DO
PROCESSO INFLAMATÓRIO *IN VIVO*.**

FLORIANÓPOLIS

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COORDENADORIA ESPECIAL DE FARMACOLOGIA

**EFEITO DE LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILSERINA NO CURSO DO
PROCESSO INFLAMATÓRIO *IN VIVO*.**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia,
Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

GUSTAVO CAMPOS RAMOS

FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2007

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Jamil pela amizade, pela orientação, paciência, e principalmente pela liberdade oferecida. Muito obrigado por tomar uma postura que coloca o educar como: criar um espaço de convivência favorável à discussões e ao crescimento à medida que convivemos, e não como algo baseado na cobrança ou na ilusão de que educar é transmitir informação.

Aos meus pais, por me incentivarem incondicionalmente a seguir o caminho acadêmico que escolhi; por tornarem isso possível ao me dar todo o suporte que precisei.

A minha noiva, Vivian, pelo intenso e apaixonante convívio nestes anos todos, e com isso tornar minha vida algo muito maior do que a ciência.

Agradeço muito à professora Sonia Gonçalves Carobrez, por vários motivos: Enquanto membro da banca examinadora deste trabalho, por ter aceitado o convite e pelas contribuições que trará para este trabalho; enquanto minha orientadora na iniciação científica, pois tenho certeza que ainda trago comigo aprendizados da época que convivemos; e enquanto vice-diretora do CCB, por fazer um trabalho dedicado ao crescimento das pessoas deste centro, e por contribuir incondicionalmente com os cursos que organizamos trazendo os professores Nelson Vaz (UFMG) e Jorge Mpodozis (Universidade do Chile).

A professora Gloria Souza, por se interessar em participar da banca examinadora desta dissertação e trazer contribuições para este trabalho.

Ao professor Antônio de Pádua Carobrez, pela disponibilidade e interesse em “perder algum tempo” em conversas sobre assuntos mais gerais como o educar e biologia evolutiva.

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto por disponibilizar equipamentos importantes para realização deste trabalho.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pela contribuição de uma forma ou de outra em minha formação científica.

Ao professor Kay Saalfeld, por continuar sendo um dos poucos professores que encontram tempo e vontade para se preocupar com os problemas mais gerais da Biologia; Por conseguir instigar alunos atentos e com isso reunir em sua volta um grupo brilhante de pessoas; Por ter sido e continuar sendo uma das pessoas mais importantes na minha formação desde os tempos da graduação.

Aos amigos Professor Jaime, Chico, Edgar, Fabiano, Edgar e George, por possibilitar um ambiente riquíssimo de discussões biológicas. Sem dúvida, as reflexões feitas a partir de conversas com vocês tiveram fortes conseqüências em minha formação.

Ao professor Mario Steindel por se preocupar com Biologia teórica.

Aos colegas de laboratório, Daniel, Bettina, Regina, Carla, Geisson, Daniele, Edir e Ângela, por estabelecer um excelente convívio e por criar no laboratório um ambiente não competitivo e bastante favorável ao crescimento pessoal e científico.

A Adriane Madeira, pelo auxílio técnico no laboratório.

Ao professor Fernando Cunha (USP) por gentilmente conceder a droga GW9662 utilizada neste trabalho.

Ao professor Mauro Martins Teixeira (UFMG) por aceitar que alguns experimentos deste trabalho fossem feitos em seu laboratório.

Ao professor Nelson Vaz (UFMG), que mesmo com a distância tem sido a maior referência da minha vida acadêmica.

Aos amigos fora do meio científico, DNLS, por me proporcionarem um grande crescimento pessoal e cultural, que sem dúvida são importantes na formação de um cientista não bitolado.

Ao apoio financeiro da Capes e CNPq.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Curva de calibração do pletismômetro.....	19
Figura 2	- Decurso temporal do edema de pata promovido por carragenina em camundongos.....	21
Figura 3	- Efeitos da administração de células apoptóticas ou fixadas sobre o edema de pata promovido por carragenina.....	30
Figura 4	- Curva dose-resposta dos efeitos do tratamento com lipossomas de PS ou PC sobre o desenvolvimento da segunda fase do edema de pata promovido por carragenina em camundongos.....	33
Figura 5	- Estudo cinético acerca dos efeitos antiinflamatórios to tratamento com lipossomas de PS.....	34
Figura 6	- Efeito do tratamento com lipossomas de PS ou PC sobre o extravasamento plasmático	36
Figura 7	- Efeito do tratamento com lipossomas sobre a produção de citocinas	38
Figura 8	- Perfil de migração de neutrófilos e macrófagos no modelo de edema de pata e efeitos do tratamento com lipossomas.....	40
Figura 9	- Participação da via de sinalização PPAR nos efeitos antiinflamatórios do tratamento com lipossomas de PS, desde uma abordagem farmacológica.....	42
Figura 10	- Efeito do tratamento com lipossomas de PS ou PC sobre o acúmulo de leucócitos no modelo de inflamação de <i>air pouch</i>	44
Figura 11	- Representação esquemática reunindo os principais achados	57

LISTA DE ABREVIATURAS

15d-PGJ₂	15 –desoxi-prostaglandina J ₂
AINE	Antiinflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
APO	Células apoptóticas
BADGE	Bisfenol-A diglicidil éter
CARR	Carragenina
COX-2	Ciclooxigenase-2
DEXA	Dexametasona
DMEM	Meio de cultura Dulbecco modificado por Eagle
ERK	Quinase responsiva a estímulos extracelulares
FIX	Células fixadas
GW9662	2-Cloro-5-nitro-N-fenilbenzamida
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
INDO	Indometacina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-Acecil-glucosaminidase
NOS-II	Óxido Nítrico Sintase-II

PBS	Salina tamponada com fosfatos
PC	Fosfatidilcolina
PPAR	Receptor ativador de proliferação de peroxissomos
PS	Fosfatidilserina
PSR	Receptor de fosfatidilserina
ROSI	Rosiglitazona
TGF-β	Fator de crescimento de fibroblastos-beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa

RESUMO

Recentemente, muita atenção vem sido dispensada não somente nos mecanismos moleculares que promovem a apoptose, mas também nas consequências da remoção destas células por fagócitos. Entretanto, este assunto foi pouco explorado em modelos *in vivo* até o momento. O objetivo do presente trabalho foi (1) estudar os efeitos antiinflamatórios da administração *in vivo* de células apoptóticas e lipossomas de fosfatidilserina (PS), um componente bem caracterizado e expresso na membrana de células apoptóticas, no modelo experimental de edema de pata promovido por carragenina em camundongos. A administração de células apoptóticas, mas não de células fixadas (10^7 células/animal, i.p., 8 h após carragenina) reduziu significativamente o edema de pata 24 h após a injeção de carragenina (salina $136,2 \pm 12,3 \mu\text{l}$; células fixadas $114,8 \pm 10 \mu\text{l}$; células apoptóticas $72 \pm 9,2 \mu\text{l}$, $P < 0,05$). Adicionalmente, a administração de lipossomas de PS, mas não de fosfatidilcolina (PC) (20-200 mg/Kg, i.p., 8 h após a carragenina) reduziu o edema de pata de maneira dose-dependente ($\text{CE}_{50} \sim 60\text{mg/Kg}$). De maneira importante, lipossomas de PS foram eficazes mesmo quando administrados 24 e 48 h após a carragenina, períodos em que a indometacina não foi eficaz (por exemplo, 48 h: carragenina $121,3 \pm 13,2 \mu\text{l}$; carragenina + PS 100 mg/Kg $55,1 \pm 7,6 \mu\text{l}$, $P < 0,05$). Camundongos tratados com PS também apresentaram um menor extravasamento plasmático, inferido pelo extravasamento do corante Azul de Evans (carragenina $4,9 \pm 0,6 \mu\text{g} \cdot \text{mg tecido}^{-1}$; PC $4,9 \pm 0,34 \mu\text{g} \cdot \text{mg tecido}^{-1}$; CARR + PS $2,1 \pm 0,3 \mu\text{g} \cdot \text{mg tecido}^{-1}$, $P < 0,05$) e

IL-1 β (salina $91 \pm 15,3$ pmol/mg tecido; CARR $625,4 \pm 61,4$ pmol/mg tecido; CARR+PC $492,5 \pm 52,3$ pmol/mg tecido; CARR+PS $251,6 \pm 30,4$ pmol/mg tecido, $P < 0,05$), mas não de TNF- α . Por fim, observou-se que os efeitos antiinflamatórios promovidos por lipossomas de PS foram revertidos com antagonistas PPAR (carrageína $133,27 \pm 11,12$ μ l; carragenina + PS $45,54 \pm 11,54$ μ l; carragenina+ PS+GW9662 $89,47 \pm 6,48$ μ l; $< 0,05$), indicando uma participação importante desta via de sinalização nas ações antiinflamatórias da PS. Em conjunto, estes dados corroboram a noção de que células apoptóticas, bem como lipossomas de PS, apresentam importantes efeitos antiinflamatórios *in vivo*. Este achado deve refletir um importante fenômeno fisiológico que participa da resolução da inflamação, e portanto uma melhor compreensão destes mecanismos pode tornar possível o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

ABSTRACT

Recently much attention has been drawn not only to the molecular mechanisms underlying apoptosis, but also to the consequences of the clearance of apoptotic bodies by phagocytes. However, this subject has been poorly investigated *in vivo*. The aim of this work was to study the effects of *in vivo* administration of apoptotic cells and phosphatidylserine (PS), a well-characterised component expressed during apoptosis, on the delayed phase of carrageenan (CARR)-triggered mouse paw oedema. Administration of apoptotic, but not formaldehyde-fixed cells (10^7 cells/animal, i.p., 8 h after CARR) significantly reduced paw oedema at 24 h (saline $136,2 \pm 12,3 \mu\text{l}$; fixed cells $114,8 \pm 10 \mu\text{l}$; apoptotic (H_2O_2) cells $72 \pm 9,2 \mu\text{l}$, $P < 0,05$). In addition, PS liposomes, but not phosphatidylcholine (PC) (20-200 mg/Kg, i.p., 8 h after carrageenan) reduced paw oedema in a dose-dependent manner ($\text{CE}_{50} \sim 60\text{mg/Kg}$). Most importantly however, PS liposomes were effective even when administered 24 h and 48 h *after* CARR (for example 48h: CARR $121,3 \pm 13,2 \mu\text{l}$; CARR+PS 100 mg/Kg $55,1 \pm 7,6 \mu\text{l}$, $P < 0,05$), whereas indomethacin (1mg/Kg, i.p. 24 h after carrageenan) had no significant effects. PS-treated mice also presented decreased levels of Evans Blue leakage (CARR $4,9 \pm 0,6 \mu\text{g} \cdot \text{mg tecido}^{-1}$; PC $4,9 \pm 0,34 \mu\text{g} \cdot \text{mg tecido}^{-1}$; CARR + PS $2,1 \pm \text{S.E.M } 0,3 \mu\text{g} \cdot \text{mg tecido}^{-1}$; $P < 0,05$) and IL-1 β (saline $91 \pm 15,3 \text{ pmol/mg tissue}$; CARR $625,4 \pm 61,4 \text{ pmol/mg tissue}$; CARR+PC $492,5 \pm 52,3 \text{ pmol/mg tissue}$; CARR+PS $251,6 \pm 30,4 \text{ pmol/mg tissue}$, $P < 0,05$). Finally, it was observed that the anti-inflammatory effects provided by PS treatment was partially

reverted by PPAR antagonists, indicating the participation of PPAR pathway to the PS effects. Taken together, these data support the notion that apoptotic cells and PS liposomes, but not PC, liposomes have anti-inflammatory effects *in vivo*. This hypothesis might represent an important phenomenon in the natural resolution of inflammation and therefore its better understanding may lead to new therapeutic anti-inflammatory approaches.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	i
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
	RESUMO.....	IV
	ABSTRACT.....	vi
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	ORIGENS DO CONCEITO DE APOPTOSE.....	1
1.2	A REDESCOBERTA DO PROCESSO DE FAGOCITOSE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS – DE MORTE SILENCIOSA (PASSIVA) A UM PROCESSO ATIVO.....	4
1.3	A INTERAÇÃO FAGÓCITO/CÉLULA APOPTÓTICA.....	6
1.4	LIPOSSOMAS DE PS COMO UMA ESTRATÉGIA FARMACOLÓGICA DE MIMETISMO APOPTÓTICO.....	8
1.5	APOPTOSE E A RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO.....	9
1.6	RECEPTORES ATIVADOS DE PROLIFERAÇÃO DE PEROXISOMOS (PPAR).	13
1.7	PROPOSTA.....	13
2	OBJETIVOS	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1	ANIMAIS.....	17

3.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	17
3.2.1	EDEMA DE PATA EM CAMUNDONGOS.....	17
3.2.2	<i>AIR POUCH</i>	22
3.3	TRATAMENTOS.....	23
3.3.1	PREPARAÇÃO E TRATAMENTO COM LIPOSSOMAS DE PC OU PS.....	24
3.3.2	OBTENÇÃO E TRATAMENTO COM CÉLULAS APOPTÓTICAS E FIXADAS.....	24
3.3.3	ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PPAR NOS EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIOS DO TRATAMENTO COM LIPOSSOMAS DE PS.....	24
3.4	ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	25
3.4.1	AVALIAÇÃO DO EXTRAVASAMENTO POR AZUL DE EVANS NO EDEMA DE PATA.....	25
3.4.2	DOSAGEM DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS MIELOPEROXIDASE (MPO) E N-ACETIL- GLUCOSAMINIDASE (NAG).....	25
3.5	DROGAS E REAGENTES.....	26
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4	RESULTADOS	28
4.1	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS E FIXADAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA FASE TARDIA DO EDEMA DE PATA PROMOVIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS	29
4.2	EFEITOS DO TRATAMENTO COM LIPOSSOMAS DE PS E PC SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO EDEMA DE PATA.....	29
4.2.1	ESTUDO DOSE E TEMPO-DEPENDENTE.....	31

4.2.2	EFEITO DO TRATAMENTO COM LIPOSSOMAS DE PS E PC SOBRE O	35
	EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO.....	
4.2.3	EFEITOS DO TRATAMENTO COM LIPOSSOMAS DE PS E PC SOBRE AS	37
	CONCENTRAÇÕES DE IL-1 β E TNF- α	
4.2.4	PERFIL DE MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS NA FASE TARDIA DE	39
	EDEMA DE PATA PROMOVIDO POR CARRAGENINA E EFEITOS DE LIPOSSOMAS DE	
	PS E PC SOBRE ESTE PERFIL.....	
4.2.5	PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PPAR NOS EFEITOS	41
	ANTIINFLAMATÓRIOS DOS LIPOSSOMAS DE PS.....	
4.3	VERIFICAÇÃO DOS EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIOS DO TRATAMENTO COM	43
	LIPOSSOMAS DE PS NO MODELO EXPERIMENTAL DE <i>AIR POUCH</i>	
5	DISCUSSÃO	45
5.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 ORIGENS DO CONCEITO DE APOPTOSE

Apoptose é um fenômeno fisiológico importante que participa na construção e manutenção de todos os metazoários (Meier *et al.*, 2000). As origens do conceito de apoptose emergiram no início da década de 50, com o reconhecimento de que a morte celular ocorria fisiologicamente durante o desenvolvimento embrionário de vertebrados (Gluksmann, 1951). Até estas observações, a morte celular, mais propriamente a necrose, era vista como um evento relacionado mais com a patologia.

Com a nova perspectiva levantada a partir do trabalho de Gluksmann (1951), vários outros grupos de pesquisa também começaram observar a morte celular ocorrendo em diversos eventos não-patológicos e logo se percebeu que este era um evento bastante generalizável e que também poderia estar relacionado com a manutenção e fisiologia de muitos tecidos animais. Neste contexto, em um estudo acerca da metamorfose de insetos, Lockshin e Williams (1965) observaram que a morte celular se passava de uma maneira extremamente coordenada, no contexto do desenvolvimento do animal como um todo. Isto é, não eram quaisquer células que morriam, senão aquelas que de certo modo participavam da completa reestruturação dos planos corporais que transformam uma lagarta em uma borboleta. Com base nesses achados, estes autores explicaram a coordenação entre morte celular e o desenvolvimento animal com base na idéia que se aceitava na época – de que o desenvolvimento se daria seguindo um programa. Desta forma, Lockshin e Williams (1965) propuseram o

termo “morte celular programada”, referindo-se no sentido em que a morte celular ocorria de acordo com um “programa desenvolvimental” do animal.

Alguns anos mais tarde, o patologista australiano Kerr (1971) observou padrão de morte celular distinto do observado na necrose e similar ao descrito por autores como Lockshin e Williams (1965). Então, em um estudo sobre a morte celular no modelo experimental de atrofia isquêmica do fígado de ratos, Kerr observou a presença de pequenos corpos citoplasmáticos arredondados contendo cromatina condensada, e numa tentativa de diferenciar este processo do então conhecido processo de necrose, cunhou o termo “necrose de encolhimento” (do inglês *shrinkage necrosis*). No ano seguinte, Kerr e Searle (1972), seguiram os estudos acerca das modificações ultraestruturais de células em processo de “necrose de encolhimento” e observaram a presença de organelas intactas no interior destas células e também perceberam um caráter aparentemente ativo e organizado deste processo de morte celular. Por estes motivos, estes autores logo perceberam que o termo “necrose de encolhimento” não era apropriado e então cunharam o termo apoptose (*apoptosis*), em analogia ao processo de queda de folhas e pétalas, comum no outono, já que esse processo se dá a partir de um ritmo anual fisiológico das plantas e não em decorrência de um dano direto.

Com este trabalho de Kerr e Searle (1972) ficou bem estabelecido que a apoptose é um processo de morte celular bem distinto do processo de necrose, tido como um processo de morte acidental, em decorrência da exposição à estímulos nocivos muito intensos. Com este trabalho, a apoptose passou a ser vista como um processo ativo, no qual estariam envolvidos a síntese de novas proteínas, manutenção da atividade metabólica, produção de energia, preservação

da integridade da membrana plasmática, bem como das organelas citoplasmáticas. A apoptose é uma condição em que a célula se reorganiza, ao invés de simplesmente edemaciar-se e romper-se. Porém ao observar tal reorganização, Kerr e Searle (1972) reforçaram que este processo de morte celular parecia seguir um curso intrinsecamente ordenado, colocando a noção de programa dentro das células apoptóticas e deram início à idéia de que as células teriam um programa intrínseco de suicídio que predetermina seu destino (Duque-Parra, 2005). Com esta visão, o foco do problema relacionado à apoptose estaria então restrito ao interior de uma célula apoptótica e não mais na coordenação deste processo com outros processos do organismo.

A partir disso, na tentativa de se elucidar tais “programas intrínsecos de suicídio”, durante a década de 90 muitos detalhes genéticos/moleculares que se passam com uma célula em processo de apoptose foram identificados e caracterizados (Twomey & McCarthy, 2005). De uma perspectiva bioquímica, em termos simples, é descrito que o processo de apoptose pode se dar através de basicamente duas vias de sinalização distintas. A primeira via é referida como “extrínseca”, a qual é desencadeada a partir da ativação de receptores de morte tipo Fas, um membro da superfamília de receptores tipo fator de necrose tumoral (TNF) (Ghobrial *et al.*, 2005). A segunda via de apoptose é conhecida como “intrínseca” ou “mitocondrial” que, quando estimulada, promove a liberação do citocromo c da mitocôndria e ativação de processos citoplasmáticos que resultam na morte celular. Todas estas vias convergem à ativação de uma cascata de proteases, as caspases, que clivam moléculas estruturais e regulatórias intracelulares como proteínas quinases, elementos do citoesqueleto, proteínas de

reparo de DNA e ativam endonucleases. Com isso, as caspases afetam a estrutura do citoesqueleto, desregulam o ciclo celular, iniciam a degradação dos ácidos nucléicos (Ghobrial *et al.*, 2005).

Entretanto, em contraste à uma grande massa de detalhes moleculares relacionados com a apoptose, o foco inicial mais geral fora perdido, e pouca atenção foi dada às conseqüências deste processo em um nível supra-celular, isto é, às conseqüências da interação de corpos apoptóticos com fagócitos e outras formas de interações celulares para a dinâmica de construção/reconstrução dos tecidos (Savill & Fadok, 2000).

1.2 A REDESCOBERTA DO PROCESSO DE FAGOCITOSE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS – DE MORTE SILENCIOSA (PASSIVA) A UM PROCESSO ATIVO

Já nas primeiras observações relacionadas às conseqüências teciduais da apoptose, viu-se que este processo não promovia inflamação, diferentemente de uma morte celular por necrose. Por exemplo, Meagher *et al.*, (1992) observaram que a necrose promovia um aumento na produção de tromboxano B₂, mas a morte celular por apoptose não promovia a liberação deste mediador inflamatório por macrófagos. Desta maneira, a apoptose recebeu a metáfora de uma “morte silenciosa”, que em conjunto com a idéia de um “programa interno de suicídio”, refletem e direcionam o olhar do pesquisador apenas para o que se passa no interior de uma célula.

Ao fim da década de 90 esta idéia começou a mudar radicalmente, a partir de alguns dados experimentais de Voll *et al.*, (1997), bem como de Fadok *et al.* (1998) que indicavam que a ausência de liberação de mediadores inflamatórios

após a apoptose não era simplesmente devida à falta de estímulos inflamatórios, mas sim a uma série de processos ativos de sinalização parácrina que resultavam em supressão da inflamação. Resumidamente, estes autores verificaram que após o contato com células apoptóticas, os macrófagos produziam e secretavam fator de crescimento de fibroblasto- β (TGF- β), um fator descrito como antiinflamatório. Além disso, Fadok *et al.*, (1998) observaram que macrófagos que interagiam com células apoptóticas tornavam-se incapazes de produzir TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6, leucotrieno C₄, tromboxano B₂ e fatores estimuladores de colônia quando desafiados com LPS.

Com base nesses achados, Fadok *et al.*, (1998) propuseram que a apoptose fosse vista como uma “morte silenciadora” ao invés de “morte silenciosa”. Na sequência destes trabalhos, alguns grupos passaram a focar no que se passa na relação entre uma célula apoptótica e fagócitos, de maneira que diversos mecanismos de interações celulares e de anti-inflamação puderam ser descritos (Fadok *et al.*, 2000; Freire-de-Lima *et al.*, 2000, Fadok *et al.*, 2001; Huynh *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2005).

Neste contexto, Freire-de-Lima *et al.* (2000) demonstraram que a apoptose promovia uma deficiência no macrófago em causar a morte intracelular do parasita intracelular *Trypanosoma cruzi* em um mecanismo que, em parte, envolvia a inibição da enzima NOS-2 após a fagocitose de células apoptóticas. Com a abertura da possibilidade de se voltar a observar a apoptose em uma perspectiva supra-celular, muitos trabalhos rapidamente demonstraram *in vitro* a relevância do

processo de apoptose para a fisiologia dos fagócitos. Entretanto, este assunto foi pouco explorado em estudos *in vivo*.

1.3 A INTERAÇÃO FAGÓCITO/CÉLULA APOPTÓTICA

Como descrito anteriormente, uma das características mais importantes do processo de apoptose é a interação e posterior remoção das células apoptóticas ou de seus restos por fagócitos. O reconhecimento de células apoptóticas é feito não só por macrófagos, mas também por células vizinhas do tecido, conhecidas como fagócitos não-profissionais. Devido à importância do evento de reconhecimento/remoção de células apoptóticas, muitos esforços vêm sendo despendidos recentemente nesse campo e muitos receptores e moléculas envolvidas nesse processo foram descritas nos últimos anos.

Uma alteração já bem definida na literatura é a exposição de fosfatidilserina (PS) na superfície de células apoptóticas, uma característica que foi primeiramente descrita na apoptose de linfócitos e posteriormente foi vista como um evento essencial na apoptose de qualquer célula de mamíferos (Henson *et al.*, 2001). Além disso, a exposição de PS é um dos primeiros eventos que se passa na superfície de uma célula em processo de apoptose, que já começa a ocorrer apenas 5 minutos após a indução de apoptose por estresse oxidativo com H_2O_2 (Mourdjeva *et al.*, 2005). Os mecanismos bioquímicos envolvidos na exposição de PS durante a apoptose foram pouco explorados até o presente momento. Brevemente, este processo parece envolver modificações na atividade de duas enzimas: (1) a ativação da enzima fosfolípídeo scramblase, que aumenta o movimento bidirecional de lipídeos através da dupla camada da membrana, um

movimento conhecido como “flip-flop” e (2) inativação da enzima aminofosfolipideo translocase, que retornaria a PS para a camada interna da membrana citoplasmática. Estas alterações enzimáticas irreversíveis, parecem estar relacionada com a atividade da enzima caspase-3 (Henson, *et al.*, 2001). Além disso, a expressão de PS parece ser um evento crítico para o reconhecimento/remoção destas células por macrófagos. Apesar de muitos outros receptores participarem deste processo, na ausência de PS a fagocitose de células apoptóticas é mínima. Adicionalmente, a seletividade e a estereoespecificidade deste processo de reconhecimento indicava o envolvimento de um receptor protéico na membrana de fagócitos. Este receptor de PS (PSR) foi logo descrito, clonado e estudado. Surpreendentemente, encontrou-se uma ampla distribuição deste receptor que inclui praticamente todas as células de mamíferos. Este achado inclusive ajuda a explicar o fato de que a maioria dos tecidos são capazes de realizar a remoção de células apoptóticas, independentemente da presença dos fagócitos profissionais. A ativação do PSR por si promove a macropinocitose em macrófagos, o que explica a importância desta sinalização para a fagocitose de células apoptóticas (Fadok, *et al.*, 2001; Henson, *et al.*, 2001).

Uma outra classe de modificações de superfície em uma célula apoptótica que implicam na remoção destas células é a alteração nos carboidratos de membrana. Alterações de carga na superfície de células apoptóticas são comuns e correlacionam-se com a formação de conglomerados de carboidratos, mas até o presente, nenhuma alteração mais específica nesse sentido, isto é, quais alterações em quais carboidratos, foi descrita. Em contrapartida, há algumas evidências que demonstram o aumento na exposição de manose, e que esta

exposição facilita o *clearance* destas células. Além destas modificações citadas, há uma série de outros receptores expressos na membrana de fagócitos que estão envolvidos no processo de fagocitose de células apoptóticas, incluindo receptores *scavenger*, receptores de LDL oxidada, CD14, a integrina $\alpha_v\beta_3$ e a glicoproteína 1, entretanto estas moléculas foram pouco estudadas neste contexto até o momento (para revisão, ver Henson *et al.*, 2001).

1.4 LIPOSSOMAS DE PS COMO UMA ESTRATÉGIA FARMACOLÓGICA DE MIMETISMO APOPTÓTICO

Diante do exposto, a PS tem sido colocada como uma molécula central, senão obrigatória, na interação entre fagócitos e corpos apoptóticos (Fadok *et al.*, 2000; Fadok *et al.*, 2001). Neste contexto, Huynh *et al.* (2001) exploraram se a PS poderia mimetizar os efeitos supressivos sobre a ativação de macrófagos que as células apoptóticas apresentavam. Neste trabalho pioneiro foi demonstrado que lipossomas contendo PS são capazes de mimetizar diversos efeitos de células apoptóticas, tais como a inibição da produção de TNF- α e a indução da expressão de TGF- β (Huynh *et al.*, 2002).

Na seqüência, este mesmo grupo seguiu com o estudo de alguns efeitos de lipossomas de PS sobre a atividade de macrófagos *in vitro*, e mais recentemente sobre algumas funções do sistema imune *in vivo*. Os autores demonstraram que enquanto uma célula apoptótica desencadeava a expressão de TGF- β 1, células apoptóticas opsonizadas, ou células apoptóticas que não expressavam PS durante o processo de apoptose falharam em induzir a expressão de TGF- β 1 por

macrófagos. Além disso, Huynh *et al.* (2002) também demonstraram que lipossomas de PS, ou a própria PS diretamente transferidas para a superfície da membrana de células normais, eram suficientes para promover a expressão de TGF- β 1 e outros componentes anti-inflamatórios em macrófagos.

Esses trabalhos recentes do grupo de Henson também ajudam a explicar alguns achados mais antigos do grupo de Aramaki, que trabalhou com os efeitos de lipossomas de diferentes constituições lipídicas sobre a atividade de macrófagos. Antes do conhecimento do caráter antiinflamatório de células apoptóticas e antes de se compreender a biologia da PS durante estes efeitos, Aramaki *et al.* (1996) observaram que lipossomas compostos de fosfolípidos aniônicos, tais como PS e ácido fosfatídico, inibiam a expressão da enzima NOS-2 em macrófagos ativados com LPS.

Com estes dados experimentais, ficou bem estabelecido na literatura que as consequências da interação entre lipossomas de PS e macrófagos são muito semelhantes às consequências da interação entre células apoptóticas/macrófagos (Huynh *et al.*, 2002, Hoffman, *et al.*, 2005), tais como a inibição da expressão de TNF- α e NOS-2 (Aramaki, 2002), bem como o aumento da produção de TGF- β 1 (Fadok *et al.*, 1998; Huynh *et al.*, 2002).

1.5 APOPTOSE E A RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO

A importância central da perspectiva que surge destes trabalhos sobre fagocitose de células apoptóticas é a possibilidade de se atentar às consequências da apoptose em um contexto da dinâmica tecidual - na relação

entre as células apoptóticas e os fagócitos - e não apenas no que se passa dentro de uma célula apoptótica. Esta perspectiva torna-se particularmente importante no caso do processo inflamatório, uma situação em que a apoptose toma maiores proporções, devido à extensa migração de neutrófilos aos tecidos. Inclusive, recentemente alguns autores têm proposto que a fagocitose de células apoptóticas seria um evento limitante no processo inflamatório que favoreceria a resolução, ao invés da persistência deste processo (veja por exemplo, Meagher *et al.*, 1992; Fadok *et al.*, 1998; Huynh *et al.*, 2002).

De maneira relevante, esta noção de apoptose como um evento ativo na realização da dinâmica dos diversos tecidos, vem sendo colocada em associação à uma área crescente no estudo da inflamação, a assim chamada resolução da inflamação (Serhan & Savill, 2005).

De maneira semelhante ao que se passou com o estudo da apoptose, o conhecimento acerca da resolução da inflamação tem passado por intensas mudanças recentemente e cada vez mais tem sido vista como um processo ativo e coordenado e não mais como um simples cessar de estímulos pró-inflamatórios.

Como colocado por Serhan e Savill (2005): “durante muito tempo o propósito do estudo da inflamação era elucidar os mediadores químicos que causam os sinais cardinais da inflamação - dor, calor, edema rubor e perda de função - para que pudessem ser desenvolvidos alguns inibidores como estratégia para o tratamento para distúrbios inflamatórios”. Esta perspectiva que dominou a farmacologia por mais de um século, sem dúvida foi importante em desenvolver um grande número de fármacos. Entretanto, ela foca majoritariamente na iniciação do processo inflamatório e negligencia quais processos são responsáveis pela

manutenção e/ou resolução de um processo inflamatório que já foi iniciado (Serhan, 2005).

Estudos sobre a produção de mediadores lipídicos ao longo das diferentes fases de um processo inflamatório tem apontado uma dinâmica interessante. Por um lado, durante momentos mais agudos de um processo inflamatório, observa-se uma produção majoritária de prostaglandina E_2 (PGE_2), a partir da atividade da enzima ciclooxigenase. A atividade desta enzima e conseqüente produção de PGE_2 é importante na geração das alterações vasculares e no aporte sanguíneo local e na sensibilização de nociceptores. Além disso, outros mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico são importantes durante os momentos iniciais da inflamação, como é o caso do leucotrieno B_4 , indispensável para tornar possível o tráfico de leucócitos do lúmen pós-capilar para o espaço intersticial. Entretanto, ao longo do processo inflamatório, são observadas importantes alterações no metabolismo do ácido araquidônico, que têm como conseqüência a resolução da inflamação. Por exemplo, à medida que a inflamação prossegue, geralmente ocorre uma alteração na expressão das enzimas que participam do metabolismo do ácido araquidônico, que passam a produzir essencialmente prostaglandina D_2 , ao invés de prostaglandina E_2 . A prostaglandina D_2 e seus derivados metabólicos, por sua vez participam de importantes processos relacionados a diminuição da inflamação, através da inibição da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias. Adicionalmente, durante o desenvolvimento da inflamação, a interação entre plaquetas e neutrófilos aderidos ao endotélio torna possível a produção de Lipoxina A_4 e B_4 , a partir do metabolismo do ácido araquidônico pela enzima lipooxigenase-5, ao invés da ciclooxigenase-2 (Serhan e Savill, 2005).

Além desta seqüência “pro-anti-inflamatória” observada na produção de mediadores lipídicos, recentemente tem sido descrito melhor a importância na seqüência de migração de leucócitos. Como já se encontra bem estabelecido na literatura que a migração de leucócitos, em especial de neutrófilos, é um evento importante nos momentos agudos da inflamação. A presença destas células no tecido é importante na remoção de microorganismos patógenos, mas a persistência destas células ativadas no tecido leva à degradação de matriz extracelular e promove danos ao hospedeiro. Em contrapartida, a remoção destas células por macrófagos que migram para o tecido em momentos mais tardios do processo inflamatório, parece ser um evento importante na resolução da inflamação. Baseado nos dados experimentais acerca da fagocitose de células apoptóticas discutido previamente, têm sido proposto que a remoção dos neutrófilos apoptóticos dos tecidos promove uma troca no fenótipo dos macrófagos, de um estado ativado para um estado reparador. Este fenômeno tem sido descrito na literatura como a seqüência de migração celular da inflamação (Serhan e Savill, 2005).

A resolução da inflamação portanto envolve a mobilização de redes de componentes (mediadores químicos e eventos celulares), orquestrados temporalmente ao longo do processo. Desta maneira, diferentes estratégias de abordagem terapêutica podem abordar não só a inibição dos mediadores pró-inflamatórios, mas também uma otimização dos fenômenos endógenos que promovem a resolução.

1.6 RECEPTORES ATIVADOS DE PROLIFERAÇÃO DE PEROXISOMOS (PPAR)

PPAR são membros de uma superfamília de receptores nucleares, fatores de transcrição ativados por ligantes e estão implicados na expressão de diversos genes relacionados com a inflamação (Zingarelli & Cook, 2005). Até o presente momento, já foram descritos 3 isotipos, sendo denominados PPAR α , PPAR β e PPAR γ . Inicialmente acreditava-se que estes fatores de transcrição participavam exclusivamente em processos ligados ao metabolismo de lipídeos. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado uma importante participação dos PPARs na proliferação e diferenciação celular, na atividade de macrófagos e no processo inflamatório de uma maneira geral. Estes estudos acerca do papel antiinflamatório dos PPARs foram impulsionados pela descoberta que a 15d-PGJ₂, um metabólito derivado da síntese de prostaglandinas exercia seus efeitos antiinflamatórios através da ligação aos receptores PPAR γ , até então reconhecidos como receptores órfãos (Gilroy *et al.*, 1999). Este subtipo, PPAR γ , é proeminentemente expresso em macrófagos e muitas funções no processo inflamatório têm sido descritas para estes receptores. O tratamento com agonistas PPAR γ promove a inibição da ativação de macrófagos por LPS *in vitro*, bem como uma inibição na produção de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, além de inibir a expressão da enzima NOS-2 (Cuzzocrea *et al.*, 2006).

1.7 PROPOSTA

Apesar de importantes avanços já terem sido alcançados neste contexto, a relação entre apoptose, fagócitos e inflamação foi pouco investigada em estudos

in vivo. Além disso, pouco se sabe acerca da relação entre a fagocitose de células apoptóticas com outros fenômenos descritos na resolução da inflamação. Assim, os principais objetivos deste estudo foram (1) estudar os efeitos da administração de liossomas de PS na resolução da fase tardia do edema de pata promovido por carragenina em camundongos; e (2) Investigar a participação da via de sinalização PPAR nos efeitos anti-inflamatórios da administração dos liossomas de PS.

2. OBJETIVOS

Recentes trabalhos na literatura têm propiciado um novo olhar acerca do processo de apoptose, e permitem que este fenômeno possa ser visto em um âmbito supra-celular e não mais como um evento silencioso e sem conseqüências para o tecido. Apesar disso, a conexão deste evento com a dinâmica do processo inflamatório, em particular a resolução, foram pouco exploradas em estudos *in vivo*. Além disso, dados experimentais apontam que a exposição do fosfolípido fosfatidilserina na membrana de células apoptóticas parece ser uma condição *sine qua non* para o processo de interação fagócitos/corpos apoptóticos e, adicionalmente, lipossomas de PS podem mimetizar importantes efeitos de células apoptóticas.

Neste contexto, os objetivos gerais do presente trabalho foram: (1) explorar a possível participação de lipossomas e PS, como uma estratégia de mimetizar células apoptóticas, no processo de resolução da inflamação; e (2) investigar a participação da via de sinalização dos fatores de transcrição PPAR nos efeitos desencadeados por lipossomas de PS.

Para o desenvolvimento desta proposta, foram incluídos os seguintes objetivos específicos:

- a) Estudar os efeitos da administração de células apoptóticas e fixadas sobre o desenvolvimento do edema de pata promovido por carragenina em camundongos.
- b) Explorar de maneira cinética e também dose-dependente os efeitos da administração de lipossomas de PS e fosfatidilcolina (PC) no desenvolvimento da fase tardia do edema de pata desencadeado por carragenina em camundongos.

c) Realizar algumas medidas bioquímicas que permitam um maior refinamento das análises da inflamação/antiinflamação, tais como:

c.1) Explorar a cinética do extravasamento do corante azul de Evans, como um marcador do extravasamento plasmático durante a fase tardia do edema de pata promovido por carragenina em camundongos, bem como os efeitos de lipossomas sobre este parâmetro.

c.2) Avaliar a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β nas patas inflamadas e nas tratadas com lipossomas.

c.3) Avaliar de maneira cinética a atividade das enzimas mieloperoxidase e N-acetil-glucosaminidase, como uma estimativa da migração de neutrófilos e monócitos para as patas inflamadas, respectivamente.

c.4) explorar, a partir de uma abordagem farmacológica com o agonista Rosiglitazona e os antagonistas BADGE e GW9662, a participação dos fatores de transcrição PPAR nos efeitos desencadeados pelos lipossomas de PS.

d) Para verificar a abrangência dos fenômenos explorados, optou-se por também explorar os efeitos dos lipossomas em um segundo modelo de estudo farmacológico da inflamação, promovida pela injeção de agentes inflamatórios no interior de uma bolha subcutânea, o modelo do “*air pouch*”.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, com idade entre 3 e 4 meses (30 – 40 g), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UPSC). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro/escuro (12/12 h) controlados. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água até o momento do experimento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC) e estão de acordo com as Diretrizes de Cuidados com Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde, dos Estados Unidos da América (NIH; USA).

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 MODELO DO EDEMA DE PATA EM CAMUNDONGOS

O edema de pata foi induzido pela injeção de carragenina (300 μg por pata) na região plantar da pata traseira direita (volume de 50 μL) dos animais. A pata contralateral (esquerda) recebeu 50 μL de salina estéril tamponada com fosfatos (PBS) e foi usada como controle. O desenvolvimento do edema de pata foi medido pletismograficamente, como previamente descrito (Ferreira, 1979), em intervalos de tempo que variaram dependendo do protocolo experimental usado. O sistema usado consiste de uma bomba peristáltica com fluxo constante (0,6 ml . min⁻¹) conectada a uma cubeta de vidro onde a pata do animal é imersa até a

articulação tibio-társica. Após a retirada da pata, a bomba é ligada e mede-se o tempo de reposição do volume deslocado pela pata, em segundos. Os resultados aferidos em segundos foram posteriormente transformados em volume a partir da regressão linear de uma curva de calibração relacionando-se volumes conhecidos contra tempo de enchimento. A diferença de volume entre a pata traseira direita e esquerda foi quantificada (em μL) e considerada como índice de edema. A Figura 1 mostra a curva de calibração utilizando-se este procedimento.

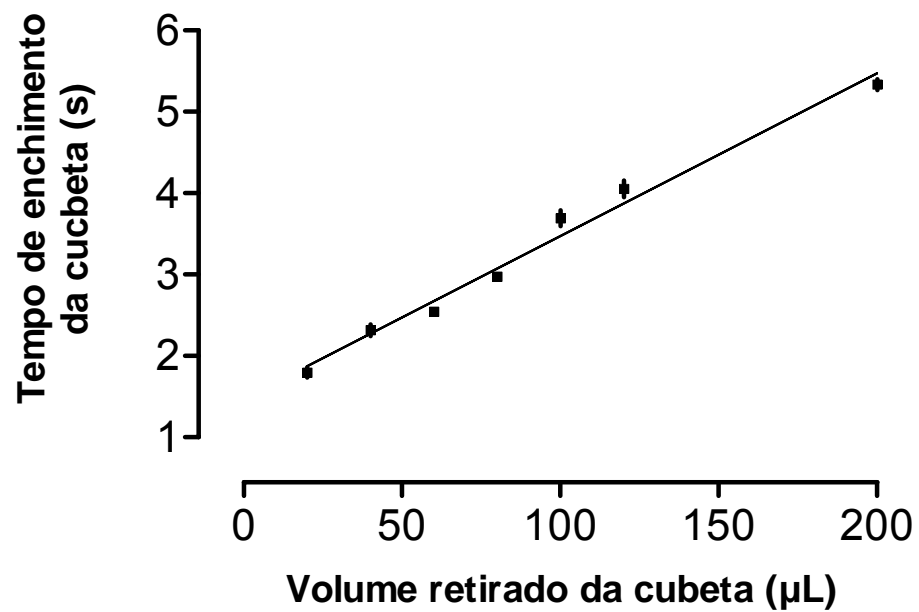


Figura 1: Curva de calibração relacionando volume retirado e tempo de enchimento da cubeta.

O modelo de edema de pata promovido por carragenina em camundongo apresenta uma peculiaridade, que é a duração do processo inflamatório. Neste modelo pode ser observado que a administração intraplantar de carragenina (300 µg por pata) em camundongos deflagra a formação de edema de pata com um perfil bifásico bastante evidente. Inicialmente, o edema desenvolve-se em poucas horas, com um pico entre 4-8 h, quando então começa a decair. Entretanto, após aproximadamente 12 h da injeção de carragenina, o edema torna a aumentar significativamente perdurando por uma escala de dias, e apresentando um pico em 2 dias (Figura 2). Sem dúvida, a primeira fase deste processo, a iniciação do edema, já foi estudada com maior profundidade que a segunda. Diferentemente, a segunda fase permite a atenção acerca dos mecanismos que participam da resolução ou manutenção do processo inflamatório, e por este motivo os objetivos deste estudo focam na segunda etapa do processo (Henriques *et al.*, 1987).

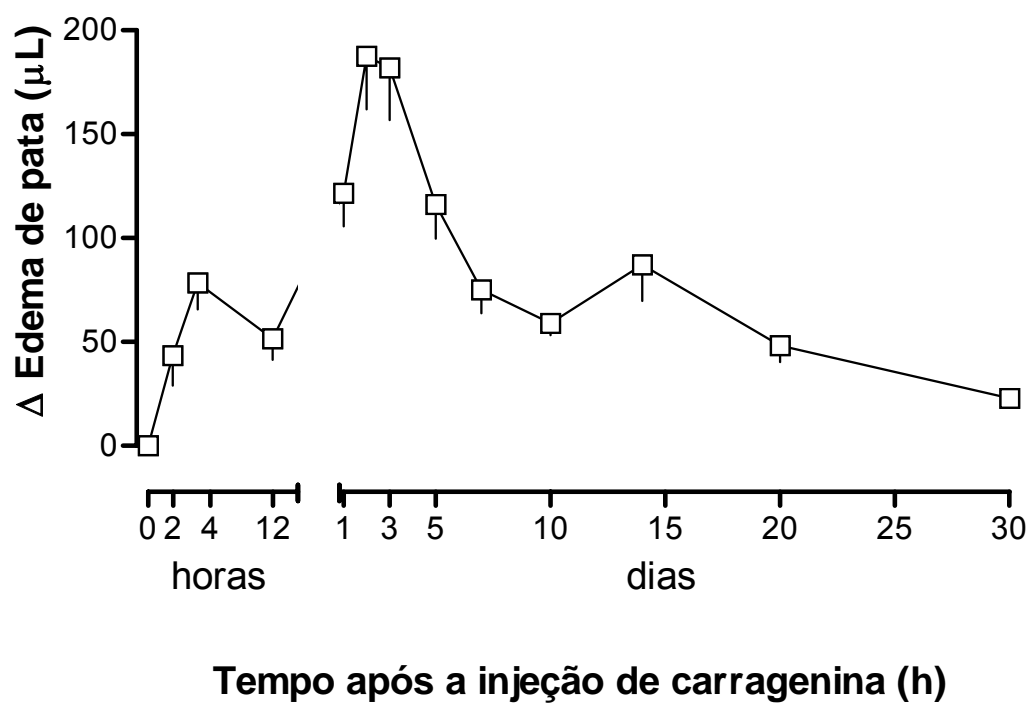


Figura 2: Decurso temporal da resposta edematogênica promovida pela injeção intraplantar de carragenina (300 μg) em camundongos.

3.2.2 MODELO DA BOLHA DE AR (“AIR POUCH”) EM CAMUNDONGOS

Com o intuito de evitar conclusões baseadas em apenas um modelo experimental, alguns experimentos realizados no modelo de edema de pata foram repetidos em um segundo modelo de inflamação bastante estabelecido, o modelo de *air pouch*. Basicamente, este modelo inclui a formação de uma cavidade artificial no dorso dos animais, a partir da injeção subcutânea de ar estéril. A principal vantagem desta metodologia é que, a partir da formação de tal cavidade, torna-se possível a administração de agentes inflamatórios diretamente no local e ainda a possibilidade de coletar-se com facilidade o exsudato para posterior análise. Existem descritos na literatura diferentes formas de indução da formação das cavidades artificiais, mas no presente trabalho foi utilizada uma metodologia de acordo com Ribeiro *et al.* (1991). Inicialmente injeta-se 5 mL de ar estéril subcutâneo no dorso dos animais. Após 3 dias a cavidade é mantida com a injeção de mais 3 mL de ar, e no sétimo dia após o início da formação da bolha pode-se injetar qualquer agente inflamatório de interesse. No caso particular deste estudo, foi injetada carragenina 10 mg de carragenina por bolha em um volume de 100 µL. Após 24 h do início do processo inflamatório, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as cavidades artificiais inflamadas foram lavadas com 1 mL de PBS para obtenção do exsudato. A partir do volume retirado das cavidades, foi feita contagem total de células, com auxílio de uma câmara de Neubauer.

3.3 TRATAMENTOS

A proposta neste trabalho, de mimetizar células apoptóticas no estudo da antiinflamação foi empregada a partir da obtenção de lipossomas de fosfolídeos contendo PS. Como controle negativo nos estudos com a PS, foi utilizado um preparado de lipossomas de fosfolídeos de fosfatidilcolina (PC).

3.3.1 PREPARAÇÃO E TRATAMENTO COM LIPOSSOMAS DE PC OU PS

Preparação dos lipossomas: vesículas de lipossomas constituídas de fosfolídeos foram preparadas de acordo com metodologia previamente descritas por Huynh, *et al.*, (2002), com pequenas alterações. Resumidamente, os fosfolídeos foram dissolvidos em uma solução de clorofórmio/metanol (90:10), evaporados em vácuo e por fim ressuspensos em PBS e agitados em ultra-som (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer, IL, EUA) durante 20 minutos. Os fosfolídeos usados neste trabalho eram constituídos de uma mistura de fosfatidilserina com outros fosfolídeos (1:1) ou eram constituídos de fosfatidilcolina, mais de 90% purificada.

Tratamento: Lipossomas de PS ou PC foram administrados através da via intraperitoneal em doses que variavam entre 20-200 mg . kg⁻¹. Todos os tratamentos com lipossomas foram feitos após a injeção de carragenina, em períodos que variavam de acordo com objetivo específico de cada experimento (por exemplo 8, 24 ou 48 h).

3.3.2 OBTENÇÃO E TRATAMENTO COM CÉLULAS APOPTÓTICAS E FIXADAS

Com o intuito de obter células apoptóticas, células de leucemia linfoblástica murina (L-1210) foram cultivadas em meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, 10 mM HEPES, pH 7.4 em estufa a 37°C sob uma atmosfera de 5% CO₂ em O₂ e em frascos de plástico de cultura. Quando a densidade celular alcançava $3 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, a apoptose era induzida de acordo com o protocolo padronizado por Mourdjeva, *et al.*, 2005. Resumidamente, as células foram tratadas com diferentes concentrações de H₂O₂ (0.015, 0.15, 0.45 e 1 mM) por 1 h à 37°C e 5% CO₂ em O₂. Em seguida, as células foram transferidas para meio fresco e cultivadas por mais 3 h. Amostras contendo 10^7 células foram injetadas por via intraperitoneal nos animais 8 h após a administração de carragenina. Como controle foram injetadas as mesmas quantidades de células que haviam sido fixadas em paraformaldeído (4%, 10 min, seguido de várias lavagens com salina).

3.3.3 ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PPAR NOS EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIOS DO TRATAMENTO COM LIPOSSOMAS DE PS

Na tentativa de elucidar possíveis mecanismos de ação antiinflamatória dos lipossomas de fosfatidilserina, este trabalho incluiu uma abordagem farmacológica com agonistas e antagonistas PPAR. Duas horas antes do tratamento convencional com lipossomas de fosfatidilserina, foi injetado o antagonista não seletivo PPAR, *bisfenol-A diglicidil eter* (BADGE, 100 mg kg⁻¹ i.p., dissolvido em DMSO 1:9 com salina) ou o antagonista seletivo PPAR-γ GW9662 (30 nmol

intraplantar). Para validação destes antagonistas estudados, foi utilizado o agonista PPAR- γ rosiglitazona (30 mg kg⁻¹ i.p.).

3.4 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Além de acompanhar o desenvolvimento do edema de pata nos animais, também foram procedidas algumas dosagens bioquímicas feitas a partir de material coletado dos animais, como descrito na seqüência.

3.4.1 AVALIAÇÃO DO EXTRAVASAMENTO POR AZUL DE EVANS NO EDEMA DE PATA

Passadas 8 h da iniciação do edema de pata com carragenina, os animais receberam tratamento com lipossomas de PS ou PC (100mg/kg, i.p.). Após 24 h da administração de carragenina, os animais receberam uma injeção intravenosa de Azul de Evans (60 mg/kg) e no tempo de 48 h os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. As patas inteiras foram então removidas e cortadas em pequenos pedaços e incubadas em solução aquosa de formamida (1/1, v/v) por 48 h a 37° C. A densidade óptica do sobrenadante foi medida a 610 nm em um espectrofotômetro (modelo U-2001, Hitachi, Japão). Os resultados foram expressos em μ g/ml de Azul de Evans, a partir da regressão linear de uma curva com concentrações conhecidas.

3.4.2 Quantificação das citocinas IL-1 β e TNF- α

Para a dosagem das citocinas, amostras de tecido subcutâneo das patas foram coletadas e rapidamente congeladas à -80°C. No momento do ensaio as amostras eram preparadas conforme previamente descrito (Barcelos, *et al.*, 2004).

Brevemente, as amostras de tecido foram homogenizadas em 1,0 mL de PBS (pH 7,4) contendo 0,05% de Tween 20. Na seqüência as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos, à 4 °C. A quantificação de IL-1 β e TNF- α foi determinada pela técnica de ELISA sanduíche, de acordo com as instruções do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, USA) e todas as amostras foram testadas em duplicata.

3.4.3 DOSAGEM DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS MIELOPEROXIDASE (MPO) E N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASE (NAG)

O influxo para o tecido inflamado de leucócitos polimorfonucleados e mononucleados foi quantificado indiretamente através da determinação da atividade da MPO e NAG respectivamente. Os animais receberam injeção intraplantar de carragenina e o perfil de migração celular durante o desenvolvimento do edema foi acompanhado nos tempos de 8, 24, 48, 72 e 120 h após a iniciação do edema. Para tal, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a pele plantar foi removida e então homogeneizada usando um homogeneizador do tipo Ultra-Turrax, em solução de tampão fosfato de sódio (80 mM; pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; 0,5 %, p/v) por 20 segundos. O homogenato resultante foi então centrifugado (20 min, 10.000 g, 4° C). O sobrenadante resultante deste procedimento foi utilizado para o ensaio de determinação da atividade das enzimas NAG e MPO.

Ensaio MPO: uma alíquota (25 μ L) do sobrenadante foi utilizada para o ensaio da MPO. A reação enzimática desenvolveu-se na presença de tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ 0,5 mM (em solução tampão fosfato 80 mM; pH 5,4) por 3

minutos em um volume final de 150 μ L. A absorbância foi medida em um leitor de placa a 650 nm (Ultra microplate reader EL 808, Biot-Tek Instruments, INC., EUA).

Ensaio NAG: 25 μ L do sobrenadante das amostras foi incubado em 100 μ L de tampão citrato (50 mM, pH 4,5), na presença do substrato *p*-nitrofenil-*N*-acetil-*b*-D-glucosaminidina (2,24 mM). As placas foram incubadas pelo período de 40 minutos à 37°C e a reação foi parada com tampão glicina (200 mM, pH 10,4) e medida num leitor de placas à 405 nm.

A quantidade de proteína total foi estimada pelo método de Bradford e os valores foram apresentados na forma de unidades de densidade óptica (D.O.) . mg proteína⁻¹.

3.5 DROGAS E REAGENTES

Carragenina lambda tipo IV, Azul de Evans, 3,3–5,5-tetrametilbenzidina (TMB), *p*-nitrofenil-*N*-acetil-*b*-D-glucosaminidina (NAG), bisfenol-A diglicidil eter (BADGE), hexadeciltrimetilammonio bromidio (HTAB) foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Os fosfolipídeos foram adquiridos comercialmente com a Lipoid GmbH (Alemanha). GW9662 (2-Cloro-5-nitro-*N*-fenilbenzamida) foi gentilmente concedido pelo professor Dr. Fernando Cunha (Departamento de Farmacologia de Ribeirão Preto). Dexamethasona (Decadron[®], Aché) e rosiglitazona (Avandia[®], GlaxoSmithKline) foram utilizadas a partir de produtos disponíveis comercialmente.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos neste trabalho como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de um número (n) de animais que variou entre 5 e 12 animais por grupo. Para a análise estatística foi usada análise de variância de uma via (ANOVA) para medidas repetidas seguida pelo teste *t* de Bonferroni.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS E DE CÉLULAS FIXADAS NO DESENVOLVIMENTO DA FASE TARDIA DO EDEMA DE PATA PROMOVIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

Inicialmente, observou-se que o tratamento com células apoptóticas, mas não com células fixadas (10^7 células por animal, 8 h após a iniciação do edema), resultou numa redução do edema de pata no tempo de 24 h (salina $136,2 \pm 12,3$ μ l; células fixadas $114,8 \pm 10$ μ l; células apoptóticas (H_2O_2 , 0,45 mM) $72 \pm 9,2$ μ l, $P < 0,05$). (Figura 3). Além disso, observou-se que a eficácia de redução do edema promovida pela administração de células apoptóticas deu-se de modo proporcional ao aumento nas concentrações de H_2O_2 utilizadas na indução de apoptose (salina $136,2 \pm 12,3$ μ l; células apoptóticas (H_2O_2 , 0,15 mM) $104,89 \pm 9,2$ μ l; células apoptóticas (H_2O_2 , 0,45 mM) $72 \pm 9,2$ μ l; células apoptóticas (H_2O_2 , 1,5 mM) $42,78 \pm 7,2$ μ l) (Figura 3).

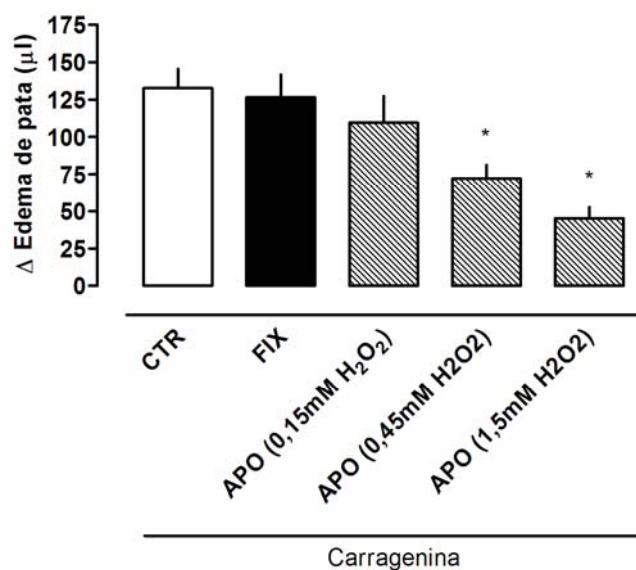


Figura 3: Efeito da administração de células fixadas (FIX) (paraformaldeído 4%) ou células apoptóticas (APO) (apoptose induzida por H₂O₂, 0,15, 0,45 ou 1,5 mM) (10⁷ células por animal, i.p. 8 h após a injeção de carragenina) sobre a fase tardia do edema de pata promovido por carragenina em camundongos. O edema de pata foi medido plestismograficamente 24 horas após a a injeção de carragenina. Teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * Indica P<0,05 em relação ao grupo controle (CTR).

4.2 EFEITOS DO TRATAMENTO COM LIPOSSOMAS DE PS E PC NO DESENVOLVIMENTO DO EDEMA DE PATA

Uma vez observado que a administração de células apoptóticas resultou numa diminuição do edema de pata promovido por carragenina em camundongos, decidiu-se investigar *in vivo* o caráter anti-edematogênico de lipossomas contendo PS, como uma estratégia farmacológica de mimetizar células apoptóticas. Como controle positivo, foi utilizada uma preparação de lipossomas contendo PC, um fosfolípido não relacionado com o processo de apoptose.

4.2.1 DEPENDÊNCIA DA DOSE E DO DECURSO TEMPORAL NO EFEITO DE PS E PC

No contexto de explorar o possível efeito antiinflamatório de lipossomas, foi observado que a administração intraperitoneal de lipossomas de PS, mas não de PC, 8 horas após a injeção de carragenina promoveu efeitos anti-edematogênicos de maneira dose-dependente numa faixa de concentrações que variou entre 20 – 200 mg . kg⁻¹ (CARR 133.22 ± 10.56 µl; CARR + PS 100 mg . kg⁻¹ 33.15 ± 5.46 µl; CARR + PC 100 mg . kg⁻¹ 113.95 ± 23.45 µl; CE₅₀ PS ~ 60 mg . kg⁻¹) (Figura 4).

Neste estudo, também foi explorado de maneira cinética a iniciação deste efeito antiinflamatório dos lipossomas de PS. Observou-se que a administração de uma única dose de lipossomas (100 mg . kg⁻¹, i.p.) 8 horas após a iniciação do edema apresentou uma eficácia muito semelhante à um protocolo de administrações repetidas em 8, 24 e 48 horas após a injeção de carragenina (CARR 13.98 ± 15.96 µl; CARR + PS 100 mg . kg⁻¹ 8 h 36.03 ± 9.60 µl; CARR + PS 100 mg . kg⁻¹ 8 + 24 + 48 h 29.22 ± 13.11 µl) (Figura 5, painel A).

Em seguida, foi monitorado o tempo necessário para a iniciação dos efeitos antiinflamatórios dos lipossomas de PS ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p., 24 h após a injeção de carragenina) e observou-se que somente 8 horas após a administração de PS que os efeitos antiinflamatórios começaram a ser observados (Figura 5, painel B).

Foi observado ainda que o tratamento com lipossomas de PS ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p.) apresentou efeitos antiinflamatórios mesmo quando realizado em períodos bem tardios do processo inflamatório, como por exemplo, 48 horas após a injeção de carragenina (CARR $121,3 \pm 13,2 \mu\text{l}$; CARR + PS 48 h $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ $55,1 \pm 7,6 \mu\text{l}$, $P < 0.05$) (Figura 5, Painel C). Esta mesma capacidade antiinflamatória em momentos mais tardios também foi similar à dexametasona, mas não à indometacina (CARR $105.07 \pm 7.43 \mu\text{l}$; CARR + INDO $1 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 24 h $105.32 \pm 28.65 \mu\text{l}$; $p > 0.05$) (Figura 5, Painel D). Lipossomas de PC também foram testados e não apresentaram efeitos antiinflamatórios em nenhum dos períodos analisados (dados não mostrados).

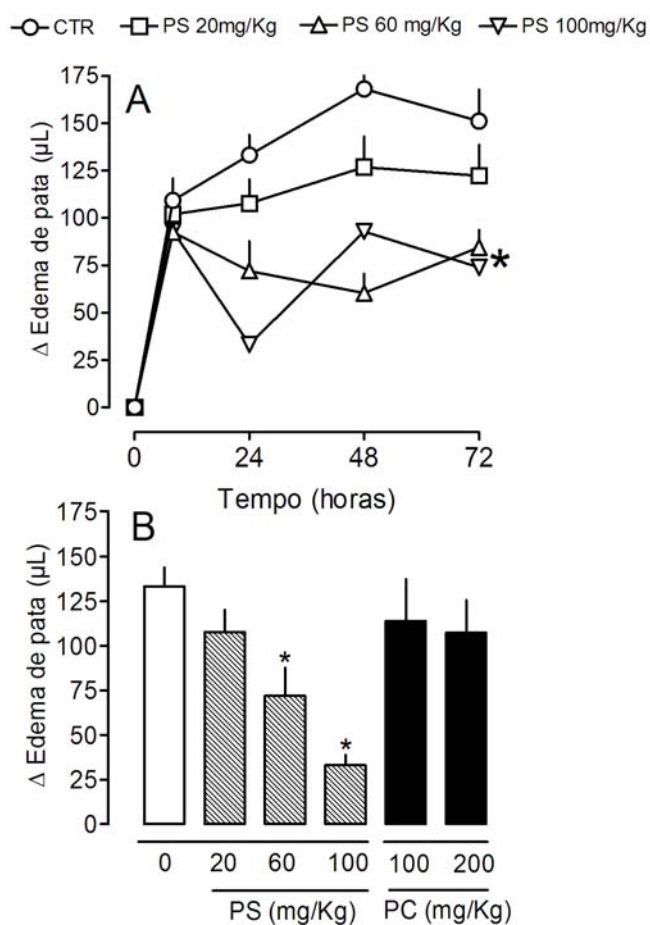


Figura 4: Curvas dose- e tempo-resposta do efeito do tratamento com lipossomas de PS e PC sobre o desenvolvimento do edema de pata promovido por carragenina em camundongos. **Painel A:** Perfil temporal da curva de tratamento com lipossomas de PS (20, 60, 100 e 200 mg . kg⁻¹, i.p. 8 horas após a injeção de carragenina). **Painel B:** Dependência da dose, sendo os dados referentes à medida no tempo de 24 horas após a iniciação do edema. Teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do teste *pos hoc* de Bonferroni. * indica P < 0,05 em relação ao grupo controle.

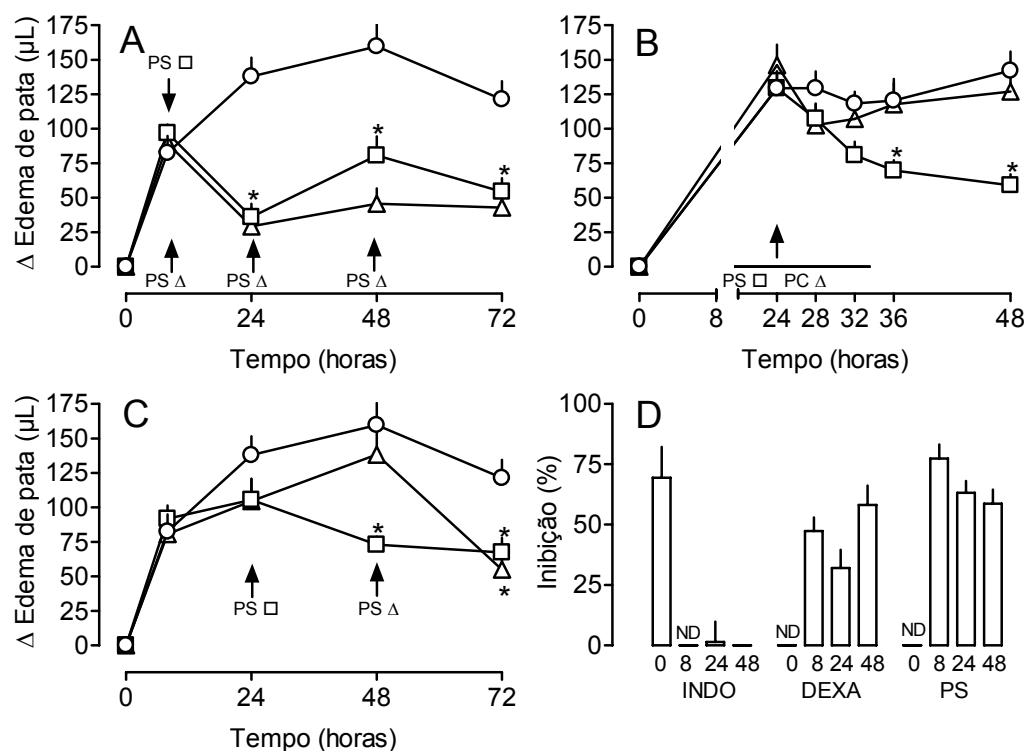


Figura 5: Estudo cinético dos efeitos antiinflamatórios dos lipossomas de PS. **Painel A:** Comparação entre administração única (□, 8 h) ou repetida (Δ, 8, 24 e 48 h) de lipossomas de PS ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p.) (as setas acompanhadas de legendas indicam os horários de tratamento). **Painel B:** Tempo para a iniciação dos efeitos antiinflamatórios dos lipossomas de PS ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p., 24 h após carragenina). **Painel C:** Administração de lipossomas em tempos mais tardios do processo inflamatório. Os lipossomas de PS ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p.) foram administrados 24 h (□) ou 48 h (Δ) após a injeção de carragenina. **Painel D:** Capacidade de inibição do edema (%) comparando a cinética de tratamento com lipossomas de PS ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p.) em relação a outras drogas de referência dexametasona ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p.) e indometacina ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p.). ND indica períodos de tratamentos não estudados. Teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do teste *pos hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.2.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM LIPOSSOMAS DE PS E PC SOBRE O EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO

A segunda fase do edema de pata promovido por carragenina em camundongos ocorreu em conjunto com a exsudação de plasma, como pôde ser inferido a partir do extravasamento do corante azul de Evans. O tratamento com lipossomas de PS (100 mg kg^{-1} , i.p., 8 h após a injeção de carrageenan) foi capaz de promover, juntamente com a inibição do edema, a inibição do extravasamento plasmático. O mesmo efeito não foi observado em decorrência do tratamento com lipossomas de PC (CARR= $4,9 \pm 0,6 \text{ } \mu\text{g}$; PC= $4,9 \pm 0,34 \text{ } \mu\text{g}$; CARR + PS= $2,1 \pm 0,3 \text{ } \mu\text{g}$, $P < 0.05$) (Figura 6).

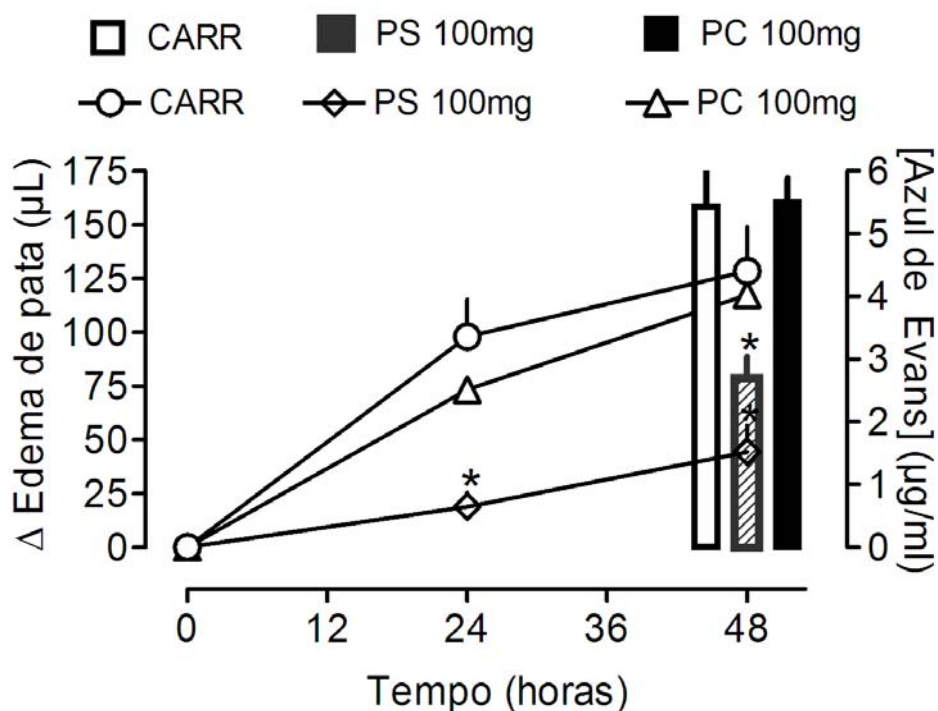


Figura 6: Medida do extravasamento plasmático, inferido pela exsudação do corante azul de Evans. O gráfico em linha, referente ao eixo das coordenadas esquerdo indica o edema de pata medido pletismograficamente de animais que receberam carragenina, tratamento com lipossomas de PS ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p., 8 h) ou com lipossomas de PC ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p., 8 h). As colunas, referentes ao eixo das coordenadas direito, indicam a quantificação da exsudação do corante azul de Evans, como um parâmetro de extravasamento plasmático. O azul de Evans ($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.v.) foi injetado 24 h após a injeção de carragenina e após mais 24 h, as patas foram coletadas para procedimento. Teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do teste *pos hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.2.3 EFEITOS DO TRATAMENTO COM LIPOSSOMAS DE PS E PC SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE IL-1 β E TNF- α

Neste trabalho, foi observado um aumento na concentração de IL-1 β em homogenatos de patas que haviam recebido carragenina 48 horas previamente. Neste contexto, observou-se que o tratamento com lipossomas de PS, mas não de PC, (100 mg . kg⁻¹, i.p., 24 horas após a injeção de carragenina) resultou também em uma diminuição nos níveis de IL-1 β (salina 91 \pm 15,3 pmol . mg de tecido⁻¹; CARR 625,4 \pm 61,4 pmol . mg de tecido⁻¹; CARR + PC 492,5 \pm 52,3 pmol . mg de tecido⁻¹; CARR + PS 251,6 \pm 30,4 pmol . mg de tecido⁻¹, P < 0.05) (Figura 7, painel A).

Neste estudo também foram quantificadas as concentrações de TNF- α em homogenatos de patas coletadas 48 horas após a administração de carragenina. Os dados encontrados para esta citocina mostram que a injeção de carragenina promoveu um aumento significativo de TNF- α , mas que o tratamento com lipossomas de PS não mudaram este perfil, ao menos em 48 horas saline 42,17 \pm 13,87 pmol . mg de tecido⁻¹; CARR 157,15 \pm 23,41 pmol . mg de tecido⁻¹; CARR + PC 175,49 \pm 54,09 pmol . mg de tecido⁻¹; CARR + PS 149,95 \pm 24,04 pmol . mg de tecido⁻¹) (Figura 7, painel B).

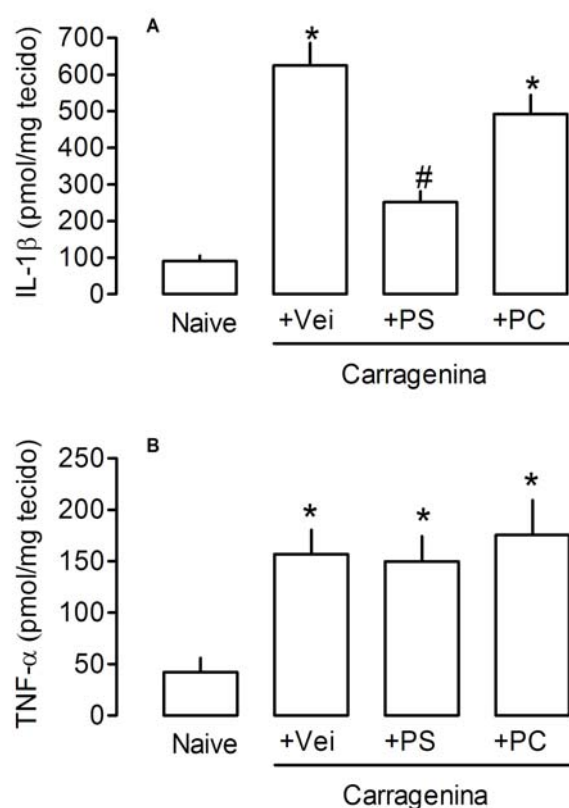


Figura 7: Quantificação de citocinas pró-inflamatórias em homogenatos de patas. **Painel A:** Efeito do tratamento com lipossomas de PS ou PC ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p.) sobre a produção de IL-1 β . Neste protocolo experimental, os animais receberam o tratamento com lipossomas 24 h após a iniciação do edema e no período de 48 h os animais foram sacrificados e as patas foram coletadas para o procedimento. **Painel B:** Efeito do tratamento com lipossomas de PS ou PC ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p.) sobre a produção de TNF- α , segundo o mesmo protocolo experimental. Teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do teste *pos hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação ao grupo controle sem carragenina (pata naive) e # indica $P < 0,05$ em relação ao grupo controle com carragenina.

4.2.4 PERFIL DE MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS NA FASE TARDIA DE EDEMA DE PATA PROMOVIDO POR CARRAGENINA E EFEITOS DE LIPOSSOMAS DE PS E PC

Após a injeção de carragenina, foi observado um proeminente aumento inicial de influxo de neutrófilos para as patas, como pôde ser inferido pela quantificação da atividade da enzima MPO. Este influxo de neutrófilos apresentou um pico em 24 horas após a injeção de carragenina (aumento de 2,4 vezes, $P < 0,05$) e então decaiu até retornar aos níveis basais em 72 horas. Por sua vez, o perfil de migração de macrófagos, apesar de aumentar modestamente já em 8 horas após a injeção de carragenina, permaneceu aumentado durante todos os períodos mensurados, até 120 h (6 vezes de aumento, $P < 0,05$), como pôde ser inferido a partir das medidas da atividade da enzima NAG (Figura 8, Painel A).

O tratamento com lipossomas de PS ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p., 24 horas após a injeção de carragenina) não apresentou nenhum efeito sobre o perfil de migração de neutrófilos (Figura 8, Painel B), porém resultou em uma discreta diminuição na migração de macrófagos (Figura 8, Painel C). A administração de lipossomas de PC não apresentou nenhum efeito sobre o influxo destes tipos celulares (dados não mostrados).

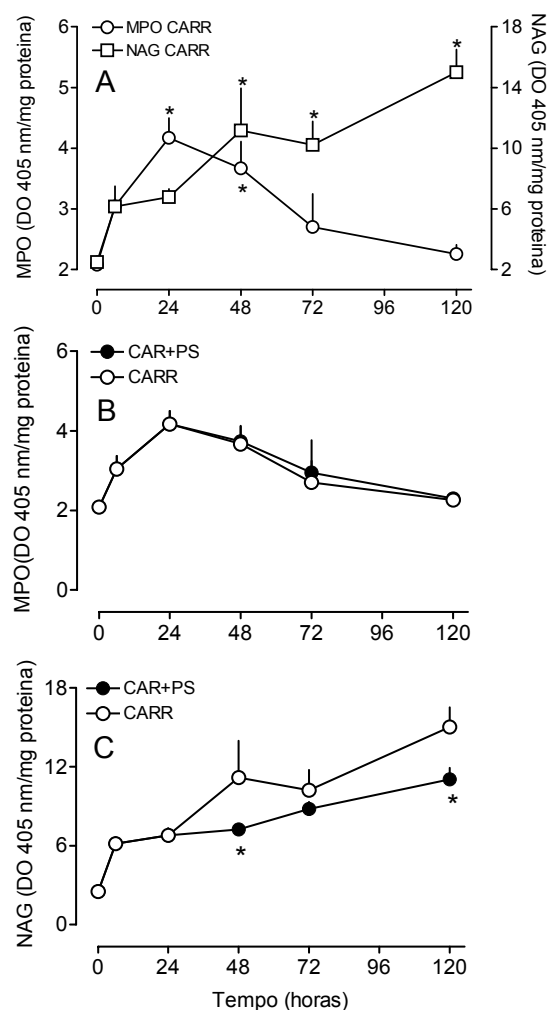


Figura 8: Perfil de influxo de neutrófilos e macrófagos para as patas inflamadas, e efeito do tratamento com lipossomas de PS. **Painel A:** Decurso temporal do perfil de migração de macrófagos e neutrófilos para as patas de animais que receberam carragenina. **Painel B:** Efeito do tratamento com lipossomas de PS (100 mg . kg⁻¹, i.p., 24 h) sobre a migração de neutrófilos, inferidos a partir da atividade da enzima MPO. **Painel C:** Efeito do tratamento com lipossomas de PS (100 mg . kg⁻¹, i.p., 24 h) sobre a migração de macrófagos, como inferido a partir da atividade da enzima NAG. Teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do teste *pos hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação aos valores basais (painel A) ou em relação aos valores da curva do grupo CARR no mesmo horário (Painel C).

4.2.5 PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PPAR NOS EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIOS DOS LIPOSSOMAS DE PS

A participação da via de sinalização PPAR foi investigada neste trabalho a partir de uma abordagem farmacológica, utilizando os antagonistas BADGE (não seletivo) e GW9662 (seletivo para o subtipo PPAR γ), tendo como controle positivo o agonista PPAR γ , a rosiglitazona. Foi encontrado que a administração do antagonista BADGE (100 mg . kg⁻¹, i.p.) ou do antagonista GW9662 (30 nmol intraplantar) 2 horas antes do tratamento com lipossomas (100 mg . kg⁻¹, i.p.; ou 0,1 mg por pata, respectivamente), promoveu uma reversão parcial dos efeitos antiinflamatórios dos lipossomas de PS (CARR 136,89 \pm 10,56 μ l; CARR + PS 53,05 \pm 8,48 μ l; CARR + PS + BADGE 96,10 \pm 10,33 μ l; CARR + PS + GW9662 89,36 \pm 6,48 μ l) (Figura 9, painel A). O tratamento com rosiglitazona (30 mg . kg⁻¹, i.p.; ou 0,3 mg por pata, respectivamente) foi utilizado como controle positivo dos antagonistas testados e de maneira similar aos lipossomas, também teve seus efeitos antiinflamatórios revertidos pelo tratamento com BADGE e GW9662 (CARR 136,89 \pm 10,56 μ l; CARR + ROSI 46,33 \pm 7,79 μ l; CARR + ROSI + BADGE 104,41 \pm 16,71 μ l; CARR + ROSI + GW9662 112,66 \pm 20,86 μ l) (Figura 9, Painel B).

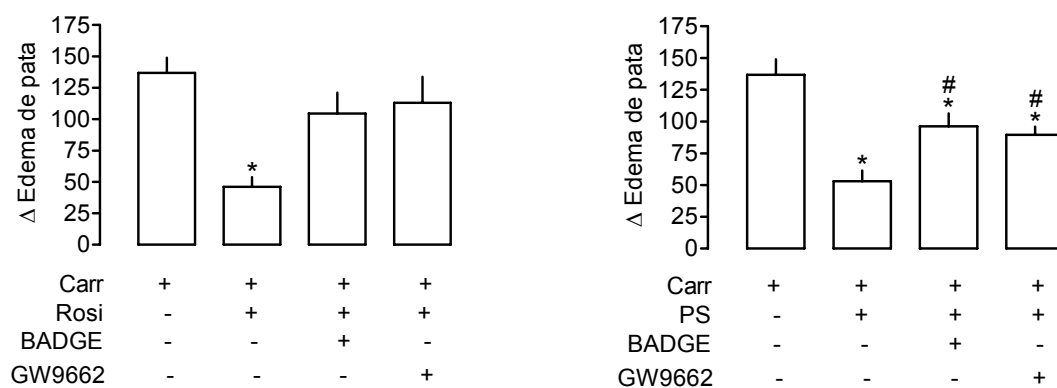


Figura 9: Dependência do receptor PPAR para os efeitos anti-inflamatórios de lipossomas de fosfatidilserina. **Painel A:** participação da via de sinalização PPAR. Concomitante com o tratamento com lipossomas de PS ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p., 24 h), os animais receberam administrações das seguintes drogas: antagonista não-seletivo PPAR BADGE ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p., 2 h antes do tratamento com lipossoma); antagonista seletivo para PPAR_{γ} GW9662 (30 nmol intraplantar, 2 h antes do tratamento com lipossomas). **Painel B:** Protocolo experimental idêntico ao Painel A, utilizando-se como controle o agonista PPAR_{γ} rosiglitazona ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p., 24 h). Teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do teste *pos hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.3 VERIFICAÇÃO DOS EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIOS DE LIPOSSOMAS DE PS NO MODELO EXPERIMENTAL DE “*AIR POUCH*”

Os efeitos do tratamento com lipossomas de PS e PC também foram avaliados em um segundo modelo de inflamação, o de “air pouch”. Neste trabalho, o parâmetro escolhido como referência foi a contagem total de células que migraram para a cavidade artificial 48 horas após a injeção de carragenina. Encontrou-se que a injeção de carragenina promoveu um extensivo aumento de influxo celular, o qual foi fortemente revertido pelo tratamento com lipossomas de PS (100 mg kg⁻¹, diretamente na cavidade artificial). Neste modelo, o tratamento com lipossomas de PC apresentou uma discreta redução no influxo celular (PBS $4 \cdot 10^5 \pm 1,04 \cdot 10^5$ células . ml⁻¹; CARR $2,51 \cdot 10^7 \pm 2,23 \cdot 10^6$ células . ml⁻¹; CARR + PS $3,15 \cdot 10^6 \pm 2,75 \cdot 10^5$ células . ml⁻¹; CARR + PC $1,55 \cdot 10^7 \pm 1,01 \cdot 10^6$ células . ml⁻¹) (Figura 10).

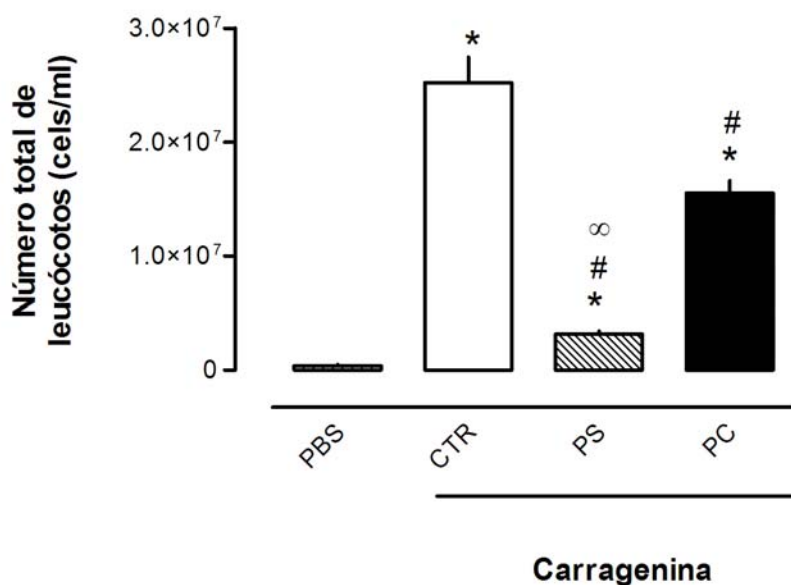


Figura 10: Estudo dos efeitos do tratamento com lipossomas de PS ou PC sobre o acúmulo de leucócitos na cavidade artificial (“*air pouch*”) no modelo de inflamação desencadeado por carragenina. Após a formação de uma cavidade artificial no dorso dos animais, o processo inflamatório foi iniciado a partir da injeção de carragenina. Após 24 h, os animais receberam tratamento com lipossomas de PS ou PC diretamente na cavidade ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). No período de 48 h após a injeção de carragenina, os animais foram sacrificados e o exsudato foi lavado e coletado para a contagem total de leucócitos. Teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do teste *pos hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação ao grupo controle naive; # indica $P < 0,05$ em relação ao grupo controle que recebeu carragenina e ∞ indica $P < 0,05$ entre os grupos PS e PC.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi observado que a administração de células apoptóticas, mas não células fixadas, promoveu uma diminuição na formação do edema de pata promovido por carragenina em camundongos. Para indução de apoptose, células da linhagem L1210 foram incubadas com a espécie reativa H_2O_2 , segundo protocolo estabelecido por Mourdjeva *et al.*, 2005. O H_2O_2 promove um estresse oxidativo nestas células e com isso inicia o processo de apoptose. No presente trabalho, não foi realizada a confirmação molecular de que de fato as células tratadas com H_2O_2 iniciaram um processo de apoptose, no entanto o trabalho prévio de Mourdjeva *et al.*, 2005 explorou amplamente o perfil temporal de expressão de PS após este mesmo protocolo de indução de apoptose por H_2O_2 . Neste referido trabalho, foi encontrado que apenas 30 minutos após o período de incubação com H_2O_2 já se iniciava a exposição de PS na superfície externa da membrana das células em processo de apoptose. De maneira importante, no presente trabalho encontrou-se que os efeitos antiinflamatórios resultantes da administração de células apoptóticas correlacionaram-se com a concentração de H_2O_2 utilizada no protocolo para indução de apoptose.

Uma vez encontrado que a apoptose pode modificar o desenvolvimento do edema de pata promovido por carragenina em camundongos, optou-se por explorar a participação de lipossomas de PS na seqüência deste trabalho. Lipossomas de PS foram inicialmente propostos como uma estratégia de mimetismo apoptótico em um estudo pioneiro de Huynh *et al.*, (2002). Neste trabalho, estes autores demonstraram que enquanto células apoptóticas desencadeavam a expressão de TGF- β 1, células apoptóticas opsonizadas ou

células apoptóticas que não expressavam PS durante o processo de apoptose, falhavam em induzir a expressão de TGF- β 1 por macrófagos. Além disso, Huynh *et al.* (2002) também demonstraram que lipossomas de PS, ou a própria PS diretamente transferidas para a superfície da membrana de células normais, eram suficientes para promover a expressão de TGF- β 1 e outros componentes anti-inflamatórios em macrófagos.

Neste contexto, ficou bem estabelecido na literatura que as conseqüências da interação entre lipossomas de PS e macrófagos são muito semelhantes às conseqüências da interação entre células apoptóticas e macrófagos (Huynh *et al.*, 2002, Hoffman, *et al.*, 2005), tais como a inibição da expressão de TNF- α e NOS-2 (Aramaki, 2002), bem como o aumento da produção de TGF- β 1 (Fadok *et al.*, 1998; Huynh *et al.*, 2002).

Com base no que foi exposto, observou-se que o tratamento com de lipossomas de PS, mas não de PC, resultou na inibição da fase tardia do edema de pata promovido por carragenina em camundongos de maneira dose-dependente em uma faixa de concentrações entre 20-200 mg . kg⁻¹. Estes resultados são consistentes com a noção de que a sinalização que envolve fosfatidilserina, uma molécula que participa da interação fagócito/célula apoptótica, tem papel relevante na resolução da inflamação. Esta idéia tem sido explorada recentemente, em modelos de estudos de ativação/inibição de macrófagos *in vitro* (por exemplo, Aramaki, 2002; Fadok *et al.*, 1998), no entanto evidências *in vivo* acerca da relevância deste processo ainda permanecem pouco exploradas (por exemplo, Huynh *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2005).

Obviamente, a exposição de PS na camada externa da membrana celular não é o único evento importante na interação entre macrófagos e células apoptóticas, apesar de ser a característica mais bem estudada (Henson *et al.*, 2006). Ainda assim, é importante ressaltar que Hoffmann *et al.*, (2001), em um estudo acerca da fagocitose de células apoptóticas, demonstraram que, independentemente do tipo de receptor utilizado por macrófagos, a ingestão de células apoptóticas não ocorria na ausência de PS.

Além de explorar os efeitos do tratamento com lipossomas de PS de maneira dependente da dose administrada, no presente trabalho também foram explorados alguns aspectos relacionados com a cinética dos efeitos desse tratamento. Uma única administração, 8 h após a iniciação do processo inflamatório, redziu a inflamação na mesma eficácia que um protocolo de tratamento com doses repetidas em 8, 24 e 48 h. Adicionalmente, encontrou-se que o efeito anti-edematogênico dos lipossomas de PS só eram observáveis após 8 h de sua administração. Em conjunto, estes dados sugerem que as consequências deste tratamento são duradouras e que estes efeitos antiinflamatórios devem incluir a síntese de novas proteínas. Neste contexto, vale ressaltar que trabalhos prévios demonstraram que após a interação com lipossomas PS *in vitro*, macrófagos iniciam a expressão de TGF- β e inibem a expressão da enzima NOS-2 (Aramaki, 2002).

No que diz respeito ao assunto da cinética do tratamento da inflamação com lipossomas de PS, o principal achado do presente estudo é a demonstração que o tratamento com lipossomas de PS pode modificar o curso da inflamação

mesmo quando administrado em períodos bastante avançados do processo (por exemplo, 48 h após a injeção de carragenina). Esta característica foi compartilhada com o tratamento com dexametasona ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), mas não com indometacina ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Isto é de grande relevância, uma vez que dados recentes da literatura têm demonstrado que a enzima COX-2 apresenta um perfil bifásico de expressão/atividade durante um processo inflamatório. Enquanto ocorre uma expressão inicial de COX-2 em neutrófilos, relacionada como os eventos vasculares e celulares da inflamação, em momentos mais tardios do processo inflamatório ocorre a expressão em macrófagos, participando de eventos ligados à resolução do processo inflamatório. Desta maneira, dados experimentais de Gilroy *et al.* (1999) apontam que quando administrados em períodos mais tardios, os inibidores da enzima COX-2, como a indometacina, podem inclusive piorar a inflamação.

Adicionalmente, observou-se que após a injeção de carragenina, houve um aumento no extravasamento plasmático, de maneira concomitante com a formação do edema de pata. Neste caso, o tratamento com lipossomas de PS inibiu o extravasamento plasmático à medida que também diminuía a formação do edema de pata em camundongos injetados com carragenina. Ao menos em parte, estes resultados de extravasamento plasmático podem ser correlacionados com os resultados encontrados nas dosagens de citocinas, já que o tratamento com lipossomas de PS promoveu também uma diminuição na produção/liberação de IL-1 β ao mesmo tempo em que promoveu uma diminuição no extravasamento plasmático e no próprio edema. A IL-1 β é um importante mediador pro-inflamatório

que participa na dinâmica da inflamação promovendo a expressão de moléculas de adesão, migração de leucócitos e aumento da permeabilidade vascular (Hallegua & Weisman, 2002; Dinarello, 1993). Portanto, a capacidade dos lipossomas de PS em reduzir a produção de IL-1 β nas patas inflamadas representa uma característica importante. Nesta linha de evidência, Fadok *et al.* (1998) demonstraram *in vitro* que macrófagos incubados com células apoptóticas apresentavam uma secreção diminuída de uma série de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β e TNF- α após o desafio com LPS. Neste mesmo trabalho, estes autores explicaram que essa inibição na secreção de citocinas pró-inflamatórias pelo tratamento com células apoptóticas era dependente da formação e sinalização parácrina de TGF- β 1 e PGE₂. Em um outro estudo, Otsuka *et al.* (2004) demonstraram que o tratamento *in vitro* de macrófagos com lipossomas aniônicos (como por exemplo, lipossomas de PS) promovia a diminuição na secreção de TNF- α por macrófagos ativados com LPS, e que esta ativação era dependente a ativação da cascata de quinases ERK.

No presente trabalho foi observado que o tratamento com lipossomas de PS não interferiu com a produção de TNF- α nos tempos analisados. Especula-se que este resultado possa ser devido aos horários do protocolo de tratamento. Neste experimento de quantificação de citocinas, o tratamento com lipossomas de PS foi realizado após 24 horas da iniciação do edema, e da coleta do material para dosagem foi realizado após 48 h da injeção de carragenina. É bem descrito na literatura que a produção de TNF- α tem um pico muito inicial no decurso temporal do processo inflamatório, inclusive um pico que é anterior ao pico de IL-

1β. No momento analisado, 48 h, as concentrações de TNF-α não se encontravam muito elevadas, ainda que significativamente superiores aos valores de uma pata controle, não inflamada. Desta forma, com base em alguns dados *in vitro* acerca dos efeitos de lipossomas de PS, bem como com base na cinética descrita na literatura sobre a produção de TNF-α, não pode ser descartada a possibilidade de que o tratamento com lipossomas de PS exerça algum efeito inibitório sobre a produção de TNF-α, caso seja administrado em períodos diferentes.

Devido a importância da migração celular no decurso do processo inflamatório, no presente estudo foi monitorado a atividade das enzimas MPO e NAG como uma forma indireta de se inferir o influxo de neutrófilos e macrófagos, respectivamente, para a pata inflamada. Uma vez que a enzima MPO é expressa majoritariamente em leucócitos granulócitos e a enzima NAG é expressa essencialmente monócitos/macrófagos, é amplamente aceito na literatura que a medida da atividade destas enzimas possam indicar de certa forma a migração de leucócitos durante o processo inflamatório (Werner and Szelenyi, 1992; Barcelos *et al.*, 2004). No que diz respeito à cinética de migração celular, os dados encontrados no presente estudo podem apontar dois eventos importantes, um acerca do decurso natural do processo inflamatório e outro acerca dos efeitos antiinflamatórios do tratamento com lipossomas de PS.

Primeiramente, no que diz respeito ao curso natural do processo de inflamação promovido por carragenina em camundongos, observou-se que o influxo de neutrófilos e macrófagos apresenta uma dinâmica bastante distinta. Como já se encontra bastante descrito na literatura (veja por exemplo Gilroy e

Coville-Nash, 2002), observou-se que após a injeção de carragenina inicia-se rapidamente um influxo de neutrófilos com um pico em 24 h, e que 48 após a iniciação do processo, retorna aos valores basais. Em contrapartida, o influxo de macrófagos, apesar de iniciar-se cedo, permaneceu aumentando durante todo o período observado (120 h). Nestes resultados, chama-se atenção que a resolução do edema coincide não só com o cessar de migração de neutrófilos, mas também com a contínua chegada de leucócitos mononucleados. A partir desses achados, coloca-se em caráter especulativo, que a resolução da inflamação deve ocorrer em consequência de eventos que se passam na relação entre os neutrófilos que chegaram ao tecido nos períodos iniciais e os macrófagos que permanecem migrando. Devido ao caráter efêmero dos neutrófilos no tecido, especula-se a possibilidade destes achados representarem de maneira indireta o fenômeno de fagocitose de células apoptóticas durante a resolução do processo edematogênico. Se isto é verdade, então também especula-se aqui que a injeção de inibidores da apoptose ou da fagocitose no sítio onde está ocorrendo esta interação entre PMN e macrófagos, deveria piorar a inflamação.

No que diz respeito aos efeitos do tratamento com lipossomas de PS sobre os perfis de migração celular, curiosamente não foram observados efeitos sobre o influxo de neutrófilos. Neste experimento, assim como no experimento de dosagens de citocinas, o tratamento com lipossomas foi realizado 24 h após a injeção de carragenina, um período em que a migração de neutrófilos já está decaindo em animais controle. Por este motivo, assim como o que se passou com as dosagens de $\text{TNF-}\alpha$, é possível que um tratamento em momentos mais iniciais

possam interferir com a dinâmica deste parâmetro também. Ainda assim, uma vez que o tratamento foi eficiente em inibir o edema de pata mesmo sem diminuir a migração de neutrófilos, pode-se inferir que os efeitos antiinflamatórios do tratamento com lipossomas de PS ocorrem de maneira independente da migração de neutrófilos. Em contrapartida, o tratamento com lipossomas de PS resultou numa discreta diminuição na migração de leucócitos mononucleares. Este dado é curioso e em parte contraditório uma vez que o aumento da atividade da enzima NAG coincide com o término do processo inflamatório.

No que diz respeito aos mecanismos moleculares de ação antiinflamatórias dos lipossomas de PS, encontra-se bastante estabelecido na literatura a participação da expressão de TGF- β 1. Entretanto, apesar de ser considerado um fator central participando dos efeitos antiinflamatórios de lipossomas de PS, ainda não está claro o que se passa em nível de ativação de fatores de transcrição e expressão gênica. Recentemente, um interesse especial tem sido colocado em torno da via de sinalização que envolve os PPARs, de modo que neste trabalho explorou-se uma possível participação destes fatores de transcrição na sinalização que envolve os lipossomas de PS. As razões pelas quais esta via de sinalização foi explorada são as seguintes: a) dados prévios de Fadok *et al.* (1998) apontaram que os efeitos inibidores sobre a ativação de macrófagos *in vitro* de células apoptóticas eram dependentes de PGs; b) neste contexto, uma série de estudos do grupo de Gilroy (Gilroy *et al.*, 1999 e 2002) tem demonstrado a importância de novos produtos do metabolismo das prostaglandinas, em especial dos metabólitos da série J, na resolução da inflamação (em especial em momentos mais tardios do

processo inflamatório); c) recentemente, esses metabólitos de prostaglandinas da série J têm sido considerados como agonistas PPAR e d) foi previamente descrito que a ativação de PPAR promove a inibição da expressão da enzima NOS-2 e de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (Nencioni *et al.*, 2003), características que são observadas também em decorrência da interação macrófagos/células apoptóticas. Somados, estes dados da literatura apontam para uma possível participação da via PPAR nos efeitos antiinflamatórios de células apoptóticas e/ou lipossomas de PS, e por esta razão esta possibilidade foi explorada neste estudo.

Os dados encontrados no presente trabalho indicam através de evidências farmacológicas que a ativação PPAR é um evento importante desencadeado pelo tratamento com lipossomas de PS e por esta razão é possível que seja também importante nos efeitos antiinflamatórios de células apoptóticas.

Em um estudo prévio, utilizando o mesmo modelo experimental de edema de pata promovido por carragenina em camundongos, Cuzzocrea *et al.*, (2004) demonstraram que a rosiglitazona, um agonista PPAR γ apresentou efeitos antiinflamatórios na fase tardia do edema de pata, mesmo quando administrado em períodos avançados do processo inflamatório. Esta é uma característica que os lipossomas de PS também apresentaram neste estudo, mas que não foi observado no tratamento com indometacina, um AINE clássico.

No presente estudo, utilizou-se este mesmo agonista no modelo experimental estudado a fim de validar o uso das drogas BADGE e GW9662, descritas na literatura como antagonistas PPAR não seletivo e seletivo para os

receptores do subtipo γ , respectivamente (Cuzzocrea *et al.*, 2004). Encontrou-se que a rosiglitazona injetada através da via intraperitoneal 24 h após a injeção de carragenina apresentou efeitos anti-edematogênicos que foram bloqueados pelos dois antagonistas estudados. Neste contexto, verificou-se que o tratamento com lipossomas de PS apresentou a mesma característica de modo que os efeitos antiinflamatórios foram revertidos pelo tratamento com os antagonistas PPAR. Por esta razão conclui-se a partir de evidências farmacológicas que as conseqüências do tratamento com PS dependem, ao menos em parte da ativação de PPAR. Obviamente, esta questão deve ser explorada em maiores detalhes em estudos futuros, mas esta é uma possibilidade que ajuda a explicar como os lipossomas de PS inibem a produção de IL-1 β .

Adicionalmente, o antagonista GW9662 indicou que o subtipo de receptores que deve ter maior relevância é o PPAR γ . Enquanto que os receptores PPAR α e PPAR β são amplamente expressos em adipócitos e relacionados com o metabolismo energético, os PPAR γ são expressos majoritariamente em macrófagos e são os mais relacionados com o controle da expressão gênica de enzimas relacionadas com a inflamação e com o *burst* respiratório.

Com base no que foi observado neste trabalho sobre um possível mecanismo de ação molecular dos lipossomas de PS, e, uma vez que toda a literatura prévia à este trabalho aponta uma proeminente participação de TGF- β 1 nos efeitos antiinflamatórios de células apoptóticas bem como de lipossomas de PS, é importante que trabalhos futuros explorem de que maneira as vias de sinalização dependente de TGF- β 1 e de PPAR γ imbricam-se. Neste contexto, por

exemplo, VanBuskirk, *et al.* (2006) apontaram que o tratamento com TGF- β 1 promovia uma redução na hipersensibilidade tipo tardia, que por sua vez dependia da ativação da via PPAR γ .

Por fim, com o intuito de esclarecer se os efeitos antiinflamatórios do tratamento com lipossomas de PS poderiam ser generalizáveis para outros modelos de inflamação, explorou-se o modelo de *air pouch*. Como parâmetro indicativo da inflamação, coletou-se o exsudato e contou-se o número total de células presente. Neste caso, o tratamento com lipossomas de PS se mostrou novamente eficaz, mesmo quando realizado 24 h após a iniciação do processo inflamatório na cavidade artificial. Curiosamente, neste caso, o tratamento com lipossomas de PC apresentara uma discreta diminuição na contagem celular. Este efeito relacionado com o tratamento com lipossomas de PC foi significativamente menor que o tratamento com lipossomas de PS e acredita-se que estes efeitos possam estar relacionados com a presença de outros fosfolipídeos aniônicos na preparação.

5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resolução da inflamação deve ser vista como um processo ativo que não deve-se somente à um simples cessar de estímulos inflamatórios. Recentemente muita atenção têm sido dada à compreensão de mecanismos envolvidos não só na iniciação do processo inflamatório mas também nos mecanismos envolvidos na manutenção/resolução deste processo (Serhan, 2004; Serhan e Savill, 2005).

No presente trabalho, explorou-se a noção de que o mimetismo apoptótico, através da preparação de lipossomas de PS, pode modificar o curso da inflamação. Neste sentido, demonstrou-se que a administração destes lipossomas resulta na resolução da fase tardia do edema de pata promovido por carragenina em camundongos. Adicionalmente, demonstrou-se que os efeitos antiinflamatórios destes lipossomas devem ser, ao menos em parte, dependentes da ativação da via de sinalização PPAR. Por fim, uma representação esquemática reunindo os principais achados do presente trabalho encontra-se representada na figura 11.

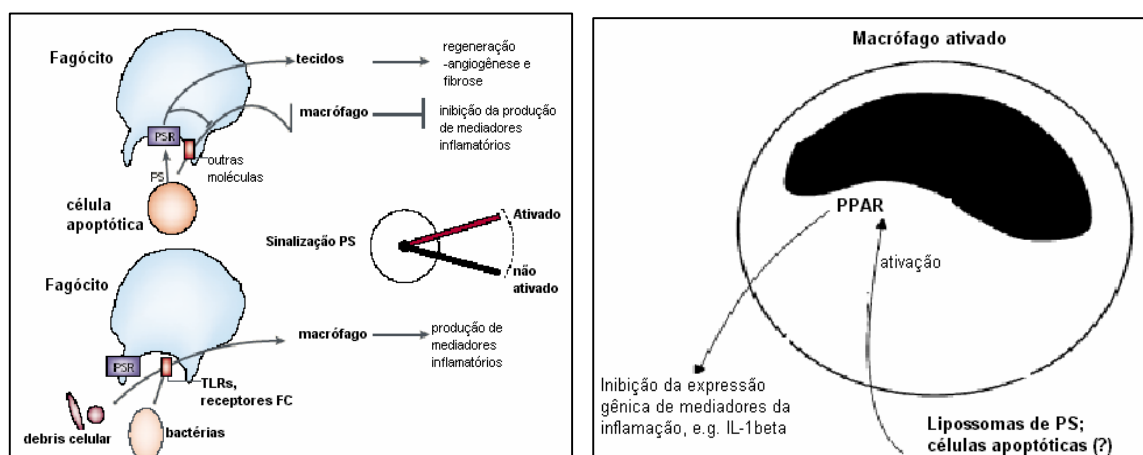


Figura 11: Representação esquemática final dos principais achados do presente trabalho, com suporte na literatura. O esquema da esquerda mostra as diferenças entre a fagocitose de bactérias (envolvendo TLR) e a fagocitose de células apoptóticas (envolvendo PS) para a atividade de macrófagos, colocando a sinalização via PS, como um ponto importante no curso da inflamação (*adaptada de Henson et al., 2001*). O esquema da direita mostra a participação da via de sinalização PPAR nos efeitos antiinflamatórios dos lipossomas de PS.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aramaki Y, Nitta F, Matsuno R, Morimura Y, Tsuchiya S, (1996). Inhibitory effects of negatively charged liposomes on nitric oxide production from macrophages stimulated by LPS. *Biochem Biophys Res Commun.* **220**:1-6.

Aramaki Y, (2002). Liposomes as immunomodulator--inhibitory effect of liposomes on NO production from macrophages. *Biol Pharm Bull.* **23**: 1267-1274.

Bracelos LS, Talvani A, Teixeira AS, Cassali GD, Andrade SP, Teixeira MM, (2004). Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflamm Res.* **53**: 576-584.

Bertrand C, Geppetti P, Baker J, Yamawaki I, Wandel J, (1993). Role of neurogenic inflammation in antigen-induced vascular extravasation in guinea pig trachea. *J Immunol.* **150**: 1479-1485.

Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Maffia P, Pattel NSA, Di Paola R, Ialenti T, Genoveze G, Chatterjee TK, Di Rosa M, Caputti AP, Thiemermann C, (2004). Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ , reduces acute inflammation. *Europ J Pharmacol.* **483**: 79– 93

Dinareello CA, (1993). Modalities for reducing interleukin 1 activity in disease. *Immunol Today*. **14**: 260-264.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM, (1998). Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF β , PGE₂, and PAF. *J Clin Invest*. **101**: 890-898.

Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM, (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**: 85-90.

Fadok VA, deCathelineau A, Deleke DL, Henson PM, Bratton DL, (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* **276**:1071-7.

Fernandes D, Assreuy J, (2004). Involvement of guanylate cyclase and potassium channels on the delayed phase of mouse carrageenan-induced paw oedema. *Eur J Pharmacol*. **501**:209-14.

Ferreira SH, (1979). A new method for variations of rat paw volume. *J Pharm Pharmacol*. **31**: 648.

Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MBP, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, Melo FG, DosReis GA, Lopes MF, (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature*. **403**:199-203.

Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. (2005) Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *Cancer J Clin*. **55**:178-194.

Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clarck MJ, Willoughby DA, (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med*. **5**:698-701.

Gilroy DW, Colville-Nash PR, (2000). New insights into the role of COX 2 in inflammation. *J Mol Med*. **78**:121-129 .

Gluksmann A, (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev*. **26**: 59-86.

Hallegua DS, Weisman MH, (2002). Potential therapeutic uses of interleukin 1 receptor antagonists in human diseases. *Ann Rheum Dis*. **61**(11):960-7.

Henriques MG, Silva PM, Martins MA, Flores CA, Cunha FQ, Assreuy-Filho J, Cordeiro RS (1987). Mouse paw edema. A model for inflammation? *Braz J Med Biol Res* **20**: 243-249.

Henson PM, Bratton DL, Fadok VA, (2001). Apoptotic cell removal. *Curr Biol.* **11**: R795–R805.

Henson PM, Hume DA, (2006). Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol.* **27**:244-250.

Hoffmann PR, deCathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL, Ridley AJ, Fadok VA, Henson PM, (2001). Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J. Cell Biol.* **155**(4):649-659.

Hoffmann PR, Kench JA, Vondracek A, Kruk A, Daleke DL, Jordan M, Marrack P, Henson PM, Fadok VA, (2005). *J Immunol.* **174**(3):1393-404.

Huynh ML, Fadok VA, Henson PM, (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* **109**(1):41-50.

Kerr JFR, (1971). Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* **105**: 13-20.

Kerr JFR, Wyllie AH & Currie AR, (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Cancer.* **26**: 239-257.

Lockshin RA, Williams CM, (1965). Programmed cell death. I. Cytology of cell degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *J Insect Physiol.* **11**:123-133.

Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW, Haslett C, (1992). Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B₂. *J Leukoc Biol.* **52**:269-73.

Meier P, Finch A, Evan G, (2000). Apoptosis in development. *Nature* **407**(6805):796-801.

Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Mandinova A, Altankova I, Kehayov I and Kyurkchiev S, (2005). Dynamics of membrane translocation of phosphatidylserine during apoptosis detected by a monoclonal antibody. *Apoptosis.* **10**: 209–217

Nencioni A, Wesselborg S, Brossart P, (2003). Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its ligands in the control of immune responses. *Crit Rev Immunol.* **23**:1-13.

Otsuka M, Tsuchiya S, Aramaki Y (2004). Involvement of ERK, a MAP kinase, in the production of TGF-beta by macrophages treated with liposomes composed of phosphatidylserine. *Biochem Biophys Res Commun.* **324**: 1400-1405.

Ribeiro RA, Flores CA, Cunha FQ, Ferreira SH. (1991) IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. *Immunol.* **73**: 472-7.

Savill J, Fadok VA, (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* **407**:784-8.

Serhan CN, (2004). A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution. *Histochem Cell Biol.* **122**:305–321.

Serhan CN, Savill J, (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* **6**:1191-7.

Strandiford TJ, Keshamouni VG, Reddy, RC (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ as a regulator of lung inflammation and repair. *Proc Am Thorac Soc.* **2**: 223-231.

Sun K, Wang Q, Huang XH, (2006). PPAR gamma inhibits growth of rat hepatic stellate cells and TGF beta-induced connective tissue growth factor expression. *Acta Pharmacol Sin.* **27**:715-23.

Twomey C, McCarthy JV, (2005). Pathways of apoptosis and importance in development. *J Cell Mol Med.* **9**:345-59.

VanBuskirk AM, Lesinski GB, Nye KJ, Carson JE, Yee LD, (2006). TGF-beta inhibition of CTL re-stimulation requires accessory cells and induces peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma). *Am J Transplant.* **6**:1809-19.

Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I, (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* **390**(6658):350-1.

Zingarelli B, Cook JA, (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock* **23**:393-9.

Welch JS, Ricote M, Akiyama TE, Gonzalez FJ, Glass CK, (2003). PPAR γ and PPAR δ negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN- γ target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 6712–6717.

Werner U, Szelenyi I, (1992). Measurement of MPO activity as model for detection of granulocyte infiltration in different tissues. *Agents actions.* **Spec No**:C101-3.

Zhang Y, Wang JZ, Wu YJ, Li WG, (2002). Anti-inflammatory effect of recombinant human superoxide dismutase in rats and mice and its mechanism. *Acta Pharmacol Sin.* **23**:439-44..

Zingarelli B, Cook JA, (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock*. **23**:393-9.